



Adaptation des températures élevées du champignon de Paris *Agaricus bisporus*

Ana María del Pilar Navarro Rodriguez

► To cite this version:

Ana María del Pilar Navarro Rodriguez. Adaptation des températures élevées du champignon de Paris *Agaricus bisporus*. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0150 . tel-01245543

HAL Id: tel-01245543

<https://theses.hal.science/tel-01245543>

Submitted on 17 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ
BIOLOGIE VÉGÉTALE

Par Ana María del Pilar, NAVARRO RODRIGUEZ

**ADAPTATION A DES TEMPERATURES ELEVEES DU
CHAMPIGNON DE PARIS *Agaricus bisporus***

Sous la direction de : Jean-Michel, SAVOIE

Soutenue le 10 Juillet 2014

Membres du jury :

M. DESCHAMPS, Alan
Mme. FARNET, Anne-Marie
M. MATA, Gerardo
M. ROUSSOS, Sévastianos
M. SAVOIE, Jean-Michel

Professeur,
Enseignant-Chercheur
Chercheur titulaire
Directeur de Recherche
Directeur de Recherche

ENSCBP
Univ. Aix-Marseille
INECOL-Mexique
IRD
INRA de BORDEAUX

Président
rapporteur
rapporteur
Examineur
Examineur

Titre : Adaptation des températures élevées du champignon de Paris *Agaricus bisporus*

Résumé : Cette recherche a été focalisée sur l'étude de la variabilité génétique et des mécanismes associés à une adaptation d'*A. bisporus* à la culture dans des conditions subtropicales. Elle a été subdivisée en trois parties : 1- identification de la diversité de l'aptitude à fructifier à haute température (FHT⁺) dans un échantillon de souches sauvages collectées dans plusieurs localités de pays d'Amérique du Nord et d'Europe. Dans cet ensemble nous avons inclus des représentants des trois variétés d'*Agaricus* à savoir: les variétés *bisporus*, *burnettii* et *eurotetrasporus*; 2- la caractérisation d'un gène candidat de thermo-tolérance dans des souches FHT⁺ et FHT⁻ et l'identification de son implication dans le caractère FHT⁺; 3- l'étude du déterminisme génétique du caractère FHT⁺.

Toutes les souches de la variété *burnettii* sont capables de produire des champignons avec de forts rendements à haute température. Cette aptitude est un élément de leur adaptation aux conditions climatiques rencontrée par la population originale. Seulement quelques souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ont révélés un bon potentiel pour fructifier à 25°C, mais sans relation avec les conditions climatiques de leur zone d'origine. Le gène étudié n'était que légèrement impliqué dans la réaction au stress thermique. Nous l'avons renommé *aap1* car nous avons montré qu'il appartient à une nouvelle sous-famille des homologues du gène *YAP1* de levure. Il n'est pas un contributeur dominant pour la thermo-tolérance d'*A. bisporus*, mais la protéine qu'il code peut être impliquée comme facteur de transcription de résistance générale au stress. En fait le caractère FHT⁺ est un caractère quantitatif sous contrôle polygénique. Il peut être hérité d'un parent de la variété *burnettii* dans une descendance inter variétale.

Au cours de ce travail, des souches d'*A. bisporus* possédant des potentiels intéressants pour la culture en conditions subtropicales ont été identifiées et les bases génétiques pour un programme de création variétale pour introduire ces caractères dans des souches déjà cultivées ont été identifiées.

Mots clés : *Agaricus bisporus*, variété *burnettii*, thermotolerance, FHT, déterminisme génétique, gène *aap1*.

Title: Adaptation of the white button mushroom *Agaricus bisporus* for fruiting at high temperature

Abstract: This work focused mainly on studying genetic variability and mechanisms associated with an adaptation of *Agaricus bisporus* for cultivation under subtropical conditions of Mexico. The research was divided into three parts: 1- Identification of the diversity for fructification at a high temperature (FHT⁺) in a pool of wild strains gathered in numerous locations of North America and Europe and

representative of the three varieties known in the species: *bisporus*, *burnettii* y *eurotetrasporus*; 2- characterization of a candidate gene of thermo-tolerance in FHT⁺ and FHT⁻ strains and identification of its involvement in the FHT⁺ trait; 3- studies on the genetic determinism of FHT⁺ trait.

All the strains of *A. bisporus* var *burnettii* produced mature sporophores at high temperatures with high yields. This ability is a part of the adaptation to the climatic conditions faced by the original population. For the *A. bisporus* var *bisporus* only some strains expressed the FHT⁺ trait and very few produced significant yield at high temperatures. There was no correlation with the geographical origin of the strains. The candidate gene studied was only weakly involved in the FHT⁺ trait. This study allowed a better characterization of one of the genes. We renamed it *aap1* because it belongs to a new sub-family of counterparts of the gene *YAP1* of yeast. It is not a dominant contributor to the thermo-tolerance of *A. bisporus*, but the protein that it encodes can be involved as a factor in transcription of general resistance to stress. Actually FHT⁺ was shown to be a quantitative trait under polygenic control, and it can be inherited from the *A. bisporus* var. *burnettii* in an intervarietal progeny.

Strains of *A. bisporus* with interesting potential for cultivation under subtropical conditions and genetic bases of breeding programs for introducing this potential in already cultivated strains had been identified.

Keywords: *Agaricus bisporus*, variété *burnettii*, thermotolerance, FHT, genetic determinism, *aap1* gen.

Unité de recherche

INRA – MycSA (Mycologie & Sécurité des Aliments) Unité 1264, INRA Bordeaux-Aquitaine BP 81 33883 Villenave d'Ornon Cedex

Remerciements

Avant de présenter mon travail de thèse, je voudrais remercier toutes les personnes qui y ont contribué.

Tout d'abord je suis reconnaissante à Jean –Michel Savoie, directeur de l'unité MycSA, de m'avoir accueillie au laboratoire pendant ces années. Un immense merci pour tout ce que j'ai pu apprendre dans ton laboratoire au cours de ces années, aussi bien sur le plan scientifique que personnel.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Christophe Billette, Marie Foulongne, Michèle Largeteau et Philippe Callac qui m'ont accordé leur confiance et qui m'ont encadrée pendant ces années. Merci pour tous les conseils que vous m'avez prodigués, pour toutes les choses que j'ai eu la chance d'apprendre grâce à vous.

Grâce à toi Christophe j'ai également appris à ne pas trop déprimer devant un résultat négatif et à aller de l'avant, chose pas toujours évidente. Merci aussi à toi par ta patiente, tes nombreuses discussions, conseils, suggestions.

Merci à vous Nathalie Ferrer et Cathy Spataro pour toutes les manipulations que vous avez réalisées et pour votre aide précieuse. Nous avons travaillé dans la bonne humeur, et grâce à vous, j'ai pu faire beaucoup plus d'analyses que si j'avais travaillé seule. Merci également à toi Christine, tu m'as beaucoup aidé en q-PCR.

Je voudrais également remercier tous les autres membres du labo MyCSA que j'ai pu côtoyer durant ma thèse et je vais essayer de ne pas en oublier: Vessela, Florence, Corine, Marie-France, Françoise, Magalie, Laetitia, Christiane Thierry, Christian, Enric, Patrick....

Je remercie aussi tous mes amis et collègues pour leurs soutiens moraux et leurs présences affectueuses, pour tous les bons moments passés, dont quelques soirées bordelaises mémorables : Adeline, Carlos, Claudia, Lina, Sébastien, Renata, Massimo, Jawad, Vessela, Aurélia, Ludovic, Mathilde, Melissa, Enric, Teresa, Kurtukian, Nassima Adimi, Philippe,...

Je remercie les membres du jury, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications à comité de lecture

Navarro P, Billette C, Ferrer N, Savoie JM, (2014)

Characterization of the *aap1* gene of *Agaricus bisporus*, a homolog of the yeast YAP1. *Comptes Rendus Biologies* 337: 29-43

Navarro P, Savoie JM, 2013.

Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce high yields of mushrooms at 25°C. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013 Jun 25. doi:pii: S1130-1406(13)00063-6. 10.1016/j.riam.2013.05.014.

Largeteau M, Callac P, Navarro-Rodríguez AM, Ferrer N, Savoie JM, (2011)

Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25°C).

Fungal Biology 115:1186-1195.

Foulongne-Oriol M, Navarro P, Spataro C, Ferrer N, Savoie JM, Deciphering the ability of *Agaricus bisporus* var. *burnettii* to produce mushrooms at high temperature (25°C). *Fungal Genetics & Biology* (Soumise)

Communications à des Congrès

Navarro P, C Billette, JM Savoie. *Poster:* Estudio del polimorfismo SNP del gen *028-1* (gen de la termotolerancia) en cepas de *Agaricus bisporus* con relación a su adaptación a la temperatura elevada. X Congreso Nacional de Micología, 20-24 septiembre, 2009, Jalisco, México.

Savoie JM, P Navarro. *Orale.* Cultivando setas comestibles y medicinales, una idea moderna para el desarrollo sustentable. X Congreso Nacional de Micología, 20-24 septiembre, 2009, Jalisco, México.

Navarro P, Largeteau M, Descorps C, Savoie JM. *Poster:* Detection and comparative expression of *028-1* (thermotolerance) and *HspA* (heat shock protein) genes in *Agaricus bisporus* strains adapted to high temperatures. 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 4-7 October, 2011, Arcachon, France.

Abréviations

A	Adénine
AB	Alberta, Canada
ADN	Acide Desoxyribonucléotide
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ASN	Average Spore Number
bp	base pair
C	Cytosine
CA	Californie
CGAB	Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux,
CpG	Ils sont les régions génomiques qui contiennent une haute fréquence de sites CpG
DNase	Desoxyribonuclease
DD-RT-PCR	Differential-Display Reverse Transcription-PCR
DTT	Dithiotreitol
EDTA	acid ethylenediaminetetraacetic
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics
FHT	fructification à haute température
FHT ⁺	S'il y a une fructification à haute température
FHT ⁻	Il n'y a pas une fructification à haute température
Fr.	France
Et al.	et les autres
Fig	figure
G	Guanine
g	gramme
Gr.	Grèce
GoTaq	Taq DNA polymérase
Hsp:	désigne une protéine de choc thermique
HSP:	désigne une famille de Hsps
<i>hsp</i> :	désigne un gène codant pour une Hsp
HSF:	désigne un facteur de transcription de la " réponse au choc thermique "
	Heat Shock Factor
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
kb	kilo bases
kDa	kilodalton

MAF	minor allele frequency
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
nm	nanomètre
MX	Mexique
NCBI	Le National Center for Biotechnology Information
PCR	polymérase chaine réaction
pH :	potentiel d'Hydrogène
Q	quartile
QTL	Quantitative Trait Loci
R	ratio
RNA	acid ribonucleic
RNase	ribonuclease
rpm	rounds par minute
Ru.	Russie
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymine
ThF	Amorce Th sens
ThR	Amorce Th antisens
µg	microgramme
UK	Union Kingdom
µl	microlitre
3' UTR	3'-untranslated region
USDA	United States Department of Agriculture
USA	United States of America
UV	ultraviolet
var.	variété
WA	Washington, USA
WB WDI	World Bank World Development Indicators
028-1	gène de la thermotolérance

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1	
 Chapitre 1. Synthèse bibliographique		
A- Le Champignon de Paris, <i>Agaricus bisporus</i>		
A-I- Aspects généraux du genre et de l'espèce	5	
I-1. Le genre <i>Agaricus</i>	5	
I-2. L'espèce <i>Agaricus bisporus</i> (Lange)Imbach	7	
I-2.1 Morphologie	7	
I-2.2. Cycle de reproduction	8	
I-2. 3. Contexte écologique	10	
I-2.4. Biodiversité et ressources génétiques disponibles	10	
I-2.4.1. La faible diversité génétique des cultivars	10	
I-2.4.2. Une source de diversité génétique dans le germoplasme d' <i>Agaricus bisporus</i>	11	
 A-II- <i>Agaricus bisporus</i>, une production agricole alimentaire aux propriétés intéressantes		
II-1. Valeur nutritionnelle d' <i>A. bisporus</i>	12	
II-2. Une alternative dans la production d'aliments	12	
II-3. Production au niveau mondial, latino-américain et mexicain	14	
II.3.1. Production mondial d' <i>A. bisporus</i>	14	
II.3.2. Production d' <i>A. bisporus</i> en Amérique Latine	15	
II-4. La situation actuelle du secteur agricole au Mexique et la production de champignons comestibles	16	
II-5. La culture du champignon de Paris en régions chaudes	17	
 B- Adaptation des champignons à la température		
B-I- La température affecte le développement des champignons :		
I-1. Température et évolution/adaptation	20	
I.2. Température d'incubation et métabolisme des cellules	21	
I.3. Conditions de stress de la cellule	22	
I-4. Température et fructification	23	
 B-II- La thermo-tolérance des champignons		24
II-1. Les deux types de thermo-tolérance : la basal et l'acquise	25	

II-2. La tolérance croisée	26
II-3. Les mécanismes de tolérance au stress	26
II-4. Les mécanismes de thermo-tolérance d' <i>A. bisporus</i>	28

C- Génomique et génétique d'*A. bisporus*

C-I- Génotypes et phénotypes	29
---	----

I-1. Phénotype	29
I-2. Plasticité phénotypique : caractéristiques et avantages	30
I-3. Les conséquences écologiques de la plasticité phénotypique	32

C-II- Génétique d'<i>A. bisporus</i>	33
---	----

II-1. Identification de marqueurs moléculaires chez <i>A. bisporus</i>	33
II-2. Génome d' <i>A. bisporus</i>	35

Chapitre 2. Diversité phénotypique d'*Agaricus bisporus* pour l'adaptation à des températures plus élevées que la condition standard de culture

Introduction	36
-------------------------------	----

Article 1 - Diversity in the ability of <i>Agaricus bisporus</i> wild isolates to fruit at high temperature (25 °C)	38
--	----

Article 2 - Selected wild strains of <i>Agaricus bisporus</i> produce high yields of mushrooms at 25°C	54
---	----

Conclusion	60
-----------------------------	----

Chapitre 3. Etude de l'implication d'un gène candidat dans l'adaptation d'*Agaricus bisporus* aux températures élevées

Introduction	63
-------------------------------	----

Article 3 - Characterization of the <i>aap1</i> gene of <i>Agaricus bisporus</i> , a homolog of the yeast YAP1	64
---	----

Article 4 - Differential expression of the gene <i>hspA</i> in FHT ⁺ strains of <i>Agaricus bisporus</i> fruiting at 17°C and 25°C	96
--	----

Conclusion	103
-----------------------------	-----

Chapitre 4. Héritabilité de l'aptitude à fructifier à 25°C chez le champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	106
--	-----

Conclusions générales	114
Bibliographie	118

Table des Illustrations

1. FIGURES

Chapitre 1

Introduction bibliographique

Figure 1. Sporophore chez les agaricales.

Figure 2. Cycle de vie des agarics.

Figure 3. Corps fructifère d'*Agaricus bisporus*.

Figure 4. Représentation schématique des cycles de vie d'*A. bisporus*.

Figure 5. Production d'*A. bisporus*.

Figure 6. Processus de culture de champignon de Paris.

Figure 7. Relation gènes et environnement = phénotype.

Figure 8. Schéma qui montre trois types de graphes d'interactions : génotypes environnement.

Chapitre 2

Article 1- Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C).

Figure 1. Geographical localization of the sampled sites.

Figure 2. Environmental conditions (temperature, relative humidity, and air flow) during mushroom cultivation in the 19m3 climatic rooms.

Figure 3. Average monthly temperature at four sampled locations, and distribution of FHT⁺ and FHT⁻ isolates.

Figure 4. Sampled sites in coastal France (A), Greece (B), and coastal California (C) showing the distribution of FHT⁺ isolates.

Figure 5. Distribution of the average mycelial growth of the var. *bisporus* isolates at four temperatures after 21 days of incubation.

Figure 6. Distribution of the average yields at 17°C.

Figure 7. Distribution of the average yields at 25°C recorded for var. *burnettii* isolates (Desert) and var. *bisporus* isolates (North America, Europe, Coast, and Inland).

Figure 8. Delay between the first picking days at 25°C compared with 17°C for var. *burnettii* isolates (Desert) and var. *bisporus* isolates (North America, Europe, Coast, and Inland).

Article 2 - Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce high yields of mushrooms at 25°C.

Figure 1. Box-plot representation of data distribution for yield and earliness measured at 17°C or 25°C on 8 FHT⁺ strains of *A. bisporus*.

Chapitre 3

Article 3 - Characterization of the *aap1* gene of *Agaricus bisporus*, a homolog of the yeast YAP1.

Figure 1. Effect of a treatment for 12 h at 32°C on vegetative mycelium grown at 25°C.

Figure 2. Annotation of the gene 028-1 of *A. bisporus* var. *bisporus* and orthologues in *Laccaria bicolor*, *Coprinopsis cinereus* and *Phanerochaete chrysosporium*.

Figure 3. Sequence alignment of the Basic Region (BR) of bZIP domain of AP-1 like transcription factors.

Figure 4. Neighbor Joining tree of *aap1* gene haplotypes of *Agaricus bisporus* strains, obtained by BIONJ analysis using Jukes and Cantor (1969) distance.

Figure 5. Single nucleotide polymorphisms for parsimony: Polymorphic nucleotide positions with at least two copies of each allele among the 16 haplotypes of *aap1* gene, H- 1 to H- 16 and the root sequence (Ade= *Agaricus devoniensis* BZIP fTF) used to build the dendrogram (Figure 4).

Figure 6. Expression of *aap1* gene in primordia obtained at 25°C relative to expression in primordia obtained at 17°C for 9 strains of *A. bisporus*.

Figure 7. Relative expression of *aap1* gene in fruiting-bodies vs. primordia obtained at 17°C (grey) or at 25°C (black).

Supplementary Figure 1: 1a and 1b. Sequences alignment of Basidiomycota proteins encoded by *028-1* gene homologs.

Supplementary Figure 2. Putative NLS and B_ZIP1 domains of Basidiomycota and Ascomycota homologs of YAP1 and *028-1*.

Supplementary Figure 3. Sequence alignment of putative chain A of PAP1 region. The most conserved part of chain A is framed and Cysteine positions in YAP1p are specified.

Supplementary Figure 4. Sequence alignment of the YAP1 redox domain, corresponding to the chain B of PAP1 region. In YAP1p, under oxidizing conditions, the formation of two disulfide bonds (C303-C598 and C310-C629) masks the NES motif (Wood *et al.* 2004).

Article 4- Differential expression of the gene *hspA* in FHT+ strains of *Agaricus bisporus* fruiting at 17°C and 25°C

Figure 1. Relative expression of *hspA* in primordia and sporophores of *A. bisporus* FHT+ strains produced at 17 and 25°C.

Chapitre 4

Figure 1. Distribution de génotypes de la progéniture d'*A. bisporus* var. *bisporus* (Bs26) x *A. bisporus* var. *burnettii* (Bs094).

Figure 2. Position des QTLs détectés pour le caractère nombre de sporophores à 25°C (N25) et à 17°C (N17), pour les 3 essais (1 en vert, 2 en bleu, 3 en rose).

2. TABLEAUX

Chapitre 1

Introduction bibliographique.

Tableau 1. Valeur nutritive de champignon de Paris.

Tableau 2. Le nombre d'espèces de champignons sauvages comestibles et médicinaux.

Tableau 3. Les catégories de marqueurs moléculaires.

Tableau 4 : Nomenclature, localisation et fonctions des différentes familles de HSP, d'après Jolly et Morimoto.

Chapitre 2

Article 1- Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C).

Table 1. Total sample of *Agaricus bisporus* isolates with reference to the geographical hierarchical level of the sampled sites, and to the habitat.

Table 2. Distribution of the FHT+ isolates in sampled locations.

Table 3. Average temperature and rainfall recorded at six sampled sites.

Table 4. FHT+ ability in relation with the microclimate represented by the date of collect.

Table 5. Habitat and FHT+ ability of the var. *bisporus* isolates.

Table 6. Distribution of the isolates according to the temperature leading to the highest radial growth rate, recorded at five times during the incubation period.

Article 2 - Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce high yields of mushrooms at 25°C.

Table 1: Yield and earliness of FHT+ strains of *A. bisporus* cultivated at 17°C or 25°C.

Table 2: Pearson correlation matrix of yield and earliness measured at 17°C or 25°C on seven FHT+ strains of *A. bisporus*.

Chapitre 3

Article 3 - Characterization of the *aap1* gene of *Agaricus bisporus*, a homolog of the yeast YAP1.

Table 1. Strains of *A. bisporus*: origin, thermo-tolerance phenotypes, *aap1* genotypes and deduced protein phenotypes.

Table 2. Inferred homologies for Chain A of Transcription factor PAP1 region between Saccharomycotina (*Saccharomyces cerevisiae*), Taphrinomycotina (*Saitoella complicata*), Agaricomycotina (*Schizophyllum commune*, *Agaricus bisporus*) and between Saccharomycotina (*S. cerevisiae*) and Pezizomycotina (*Tuber melanosporum*).

Table 3. Classification of strains based on their *Aap1* peptide sequences and their thermo-tolerance.

Article 4- Differential expression of the gene *hspA* in FHT+ strains of *Agaricus bisporus* fruiting at 17°C and 25°C.

Table 1. *Agaricus bisporus* strains

Chapitre 4

Tableau 1. Descriptif de caractères étudiés dans la descendance.

Tableau 2. Coefficients de corrélation de la combinaison des trois essais appliqués.

Tableau 3. Coefficients de corrélation des trois essais appliqués.

Table 4. Analyses de variance des trois caractères à deux températures.

INTRODUCTION

Introduction

La diversité biologique est constituée par la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Cela inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs (Wilson, 1997). Les champignons représentent une des plus grandes branches de l'Arbre de la Vie. Les organismes de la lignée des champignons sont: les champignons à chapeau, les rouilles, les charbons, les vesses de loup, les truffes, les morilles, les moisissures et les levures, ainsi que de nombreux organismes moins connus (Alexopoulos *et al.* 1996). Le biologiste britannique David Hawksworth a établi qu'il pourrait y avoir une proportion de six espèces de champignons pour une espèce de plantes vasculaires, de sorte qu'il devrait y avoir entre 1 et 1,5 million d'espèces formant le règne des champignons, alors qu'on n'en a identifié qu'environ 70 000 à ce jour (Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.* 1995). Ils ont un énorme impact sur les sociétés humaines et sur le fonctionnement des écosystèmes en raison de leurs diverses activités comme dégradateurs (décomposeurs), comme agents pathogènes des plantes et des animaux et aussi en raison d'associations symbiotiques avec des organismes hôtes. Et peut-être plus que tout autre groupe d'organismes non photosynthétiques, les champignons sont des acteurs essentiels du cycle du carbone. Ils sont capables de dégrader pratiquement tout biopolymère d'origine naturelle ou anthropique. En tant que tels, les champignons sont très prometteurs dans le développement de carburants alternatifs, la séquestration du carbone et la biorestauration des écosystèmes contaminés (CBS-KNAW centre de la biodiversité fongique, 2011). Pour utiliser des champignons pour le bénéfice de l'humanité, une compréhension précise de ce qu'ils font, comment ils fonctionnent, et comment ils interagissent dans des environnements naturels et synthétiques est nécessaire.

Parmi les champignons importants en milieux forestiers et prairiaux, certains ont une existence de type saprophyte, alors que d'autres vivent en symbiose avec des racines de végétaux. Dans ce cas, ils leur fournissent en retour des minéraux, comme le phosphore, qu'ils extraient du sol

plus efficacement que le système racinaire de leurs hôtes. Les saprophytes se divisent en lignicoles qui dégradent le bois mort et humicoles qui tirent leur nourriture de l'humus, une riche matière organique humide qui provient de matières végétales en décomposition.

Les champignons macroscopiques sont consommés par les hommes comme aliments et médicaments depuis des millénaires et leur culture a été développée, comme pour les plantes, afin d'obtenir une production maîtrisée. Le Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) est le plus connu et le premier champignon comestible cultivé dans le monde. C'est un saprophyte humicole qui est cultivé sur des composts formés de résidus végétaux divers et de fumiers ou fientes de volailles. Sa culture s'est beaucoup développée dans les régions tempérées, du fait des températures assez basses nécessaires pour la production de sporophores par les cultivars disponibles actuellement. Historiquement, la culture a été initiée au 18^{ème} siècle en France, à partir d'isolats sauvages qui ont été sélectionnés progressivement. Cette sélection a conduit graduellement à une perte de diversité biologique de l'espèce qui n'était plus recherchée dans la nature. La culture réalisée initialement dans les caves parisiennes s'est ensuite déplacée dans les carrières de la vallée de la Loire pour bénéficier de larges étendues avec une régulation naturelle de la température entre 14 et 16°C. De nos jours les cultures dans les pays occidentaux sont réalisées en grande partie dans des chambres climatisées pour assurer l'optimisation de la production et la stabilité de la qualité des champignons. Les températures utilisées pour la fructification sont encore comprises entre 15 et 19 °C. Ce contexte n'est pas favorable au développement de petites productions suivant les principes d'une agriculture durable, en particulier dans des pays aux climats chauds.

Cependant grâce aux efforts de développement d'un germoplasme mené depuis les années 1990 par l'INRA, des isolats sauvages d'*A. bisporus* ont été collectés dans divers endroits, dont des régions chaudes. Ceci laisse à penser que l'espèce possède une diversité de sensibilité à la température, ce qui pose des questions sur la biologie de ce champignon et ouvre des perspectives d'application pour sa culture dans des régions chaudes.

Dans ce contexte, et suivant les règles qui prévalent dans les programmes officiels de coopération mutuelle scientifique et technologique entre le Mexique et la France à travers le programme ECOS-Nord, nous avons établi un projet de recherche dans lequel l'objectif principal était d'identifier la variabilité génétique et les mécanismes associés à une adaptation d'*A. bisporus* à la culture dans des conditions subtropicales. Ces travaux de recherche ont pour

finalité appliquée d'obtenir une souche capable de fructifier dans les conditions ambiantes qui priment au Mexique. L'étude des bases biologiques de l'effet de la température sur la production de sporophores est nécessaire pour l'obtention d'une souche d'*A. bisporus* qui serait capable de fructifier à température élevée, qui donnerait des hauts rendements de sa production et qui en plus réunirait des aspects morphologiques attractifs pour les consommateurs.

Pour tendre vers cette finalité, nous avons réalisé des études à trois niveaux, biodiversité phénotypique, analyse d'un gène candidat et déterminisme génétique du caractère 'possibilité de produire des sporophores à plus haute température que les cultivars actuels' :

- 1- Connaissance de la diversité de la sensibilité à la température en relation avec les populations d'origine des souches et sélection de souches pour les études ultérieures.

Après un premier chapitre de synthèse bibliographique permettant de mieux cerner le matériel biologique étudié et les enjeux des travaux, Le chapitre 2 de ce rapport de thèse est consacré à l'évaluation et l'analyse de la diversité phénotypique pour l'adaptation des souches sauvages et commerciales d'*A. bisporus* à des températures plus élevées que les conditions standard de culture. Pour cela, nous avons exploité la collection de souches d'*A. bisporus* disponible. Des souches capables de croître et de fructifier à plus haute température que les cultivars traditionnels (le seuil de 25°C a été choisi) ont été sélectionnées dans un ensemble de 130 isolats, collectés dans plusieurs localités des pays d'Amérique du Nord et d'Europe.

Les données obtenues ont été confrontées avec des données de type écologique sur les régions dans lesquelles elles furent récoltées, en tenant compte de la latitude à laquelle prospère la souche. Tout cela avec l'objectif de déterminer s'il existe une corrélation entre ces données et le caractère de fructification à haute température.

Des essais de culture à une échelle pilote ont été conduits pour confirmer les potentiels de souches issues de cette sélection.

- 2- Définition de l'implication de gènes candidats dans l'adaptation aux températures élevées.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié finement le gène *028-1*, qui avait déjà été rapporté par Chen et coll. en 2007 comme étant un gène lié à la thermo-tolérance du mycélium d'une souche particulière d'*A. bisporus* en Chine.

Après avoir vérifié l'implication dans la thermo-tolérance du mycélium sur quelques souches sélectionnées dans le chapitre 2, le polymorphisme de séquence nucléotidique a été défini sur un échantillon représentant un quart des souches étudiées dans le chapitre 2. Ces travaux ont permis une meilleure annotation du gène que nous avons rebaptisé *aap1* et une étude phylogénétique des relations évolutives entre les souches étudiées. Par ailleurs, nous avons recherché les relations potentielles entre le polymorphisme mis en évidence et la capacité de souches à fructifier ou non à haute température. Sur un sous-échantillon de souches capables de fructifier à 25°C, nous avons cherché à déterminer si l'implication du gène *aap1* pouvait être révélée par une régulation différentielle d'expression au moment de la fructification. Les niveaux d'expression ont été mesurés par Q-PCR afin de comparer les champignons qui avaient été produits à 17°C et à 25°C. Un second gène candidat (*hspA*, protéine de choc thermique) a été étudié en parallèle.

3- Etude de la génétique du caractère associé à la possibilité de fructifier à haute température.

Dans le chapitre 4, le déterminisme génétique de l'aptitude à produire des sporophores matures à 25°C (FHT+) a été étudié à l'aide d'une descendance de 90 individus qui avait été obtenue antérieurement pour un autre objectif, grâce au croisement entre une souche qui a été caractérisée comme FHT+ et une souche qui a été caractérisée comme FHT- dans le chapitre 2. Les phénotypes ont été obtenus avec trois essais de culture et 2 répétitions. Des corrélations entre les caractères FHT et d'autres caractères mesurés ont été recherchées.

En conclusion, une confrontation et une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces recherches sont présentées. L'analyse critique du travail permet de dégager des perspectives pour l'application pratique des études réalisées et l'obtention de connaissances nouvelles sur l'adaptation d'*A. bisporus* à la fructification à 25°C, et plus.

CHAPITRE 1

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Cette synthèse bibliographique a pour objectif de présenter le matériel biologique objet de cette thèse, à savoir le Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, en insistant sur les éléments exploités au cours du travail suivant. Des éléments permettant de mieux cerner le contexte sociétal des études sont également proposés. De plus des considérations générales sur la thermotolérance et les liens entre phénotype et génotype sont proposées.

A- Le Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*

A-I- Aspects généraux du genre et de l'espèce

I-1. Le genre *Agaricus*

Le genre *Agaricus*, appartenant à la famille des Agaricaceae, est généralement décrit avec un piléus blanc, jaune ou brun; charnu, généralement lisse et blanc chez les exemplaires jeunes. Il se recouvre ensuite de fibrilles ou de squames de couleur ocrée à mesure qu'il s'ouvre. Les lamelles libres sont roses lorsque le champignon est jeune, puis brun-noir à noires lorsqu'il vieillit, avec une trame régulière quand elles sont jeunes, devenant plus tard irrégulières; et elles portent une sporée qui va du brun pourpre à brun foncé. Les basidiospores sont lisses avec une paroi pseudo-amyloïde (Mitchell et Bresinsky, 1999). Les *Agaricus* appartiennent à la Division (ou Phylum) des Basidiomycota (Hibbett *et al.* 2007) lesquels se caractérisent par la formation de leurs spores sexuelles à l'extrémité des

structures appelées basides qui sont situés dans la partie fertile du corps fructifère ou hyménium (Figure 1).

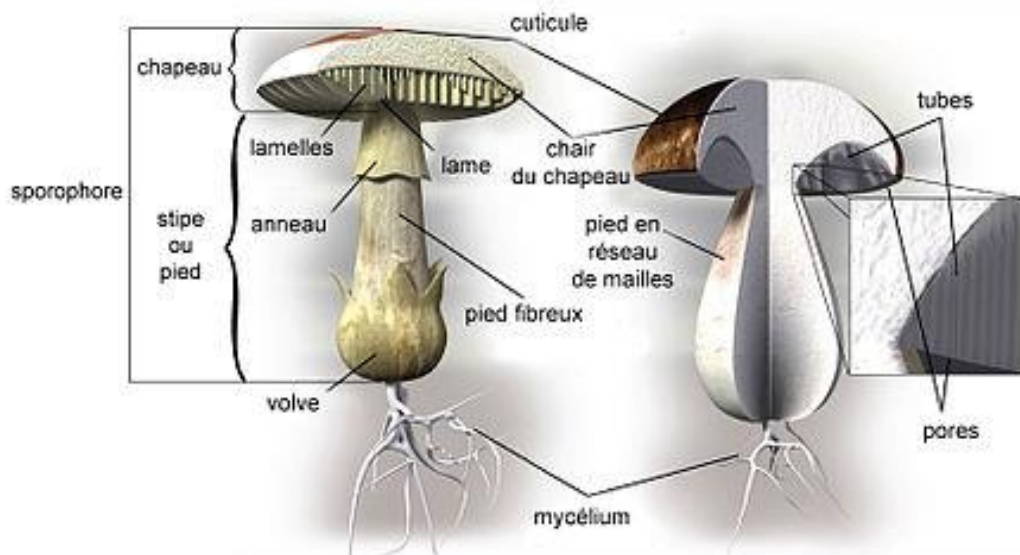


Figure 1. Sporophore chez les agaricales

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/30/Sch%C3%A9ma_champignon.jpg/800px-Sch%C3%A9ma_champignon.jpg)

Généralement chez les basidiomycètes, une basidiospore mononuclée donne naissance à un mycélium primaire monocaryotique haploïde. Durant la croissance de ce mycélium la rencontre d'un autre mycélium primaire compatible avec le premier, conduit à une fusion par anastomose qui aboutit à un mycélium secondaire dicaryotique, capable de croître de façon végétative sans fusion des noyaux. Quand les conditions environnementales deviennent moins favorables à la croissance végétative, des primordia se forment et ils aboutissent à la formation des sporophores. Dans les basides se produit la fusion de noyaux ou caryogamie suivi de la méiose qui conduit à la formation de deux, quatre et plus rarement huit basidiospores (haploïdes) (Figure 2).

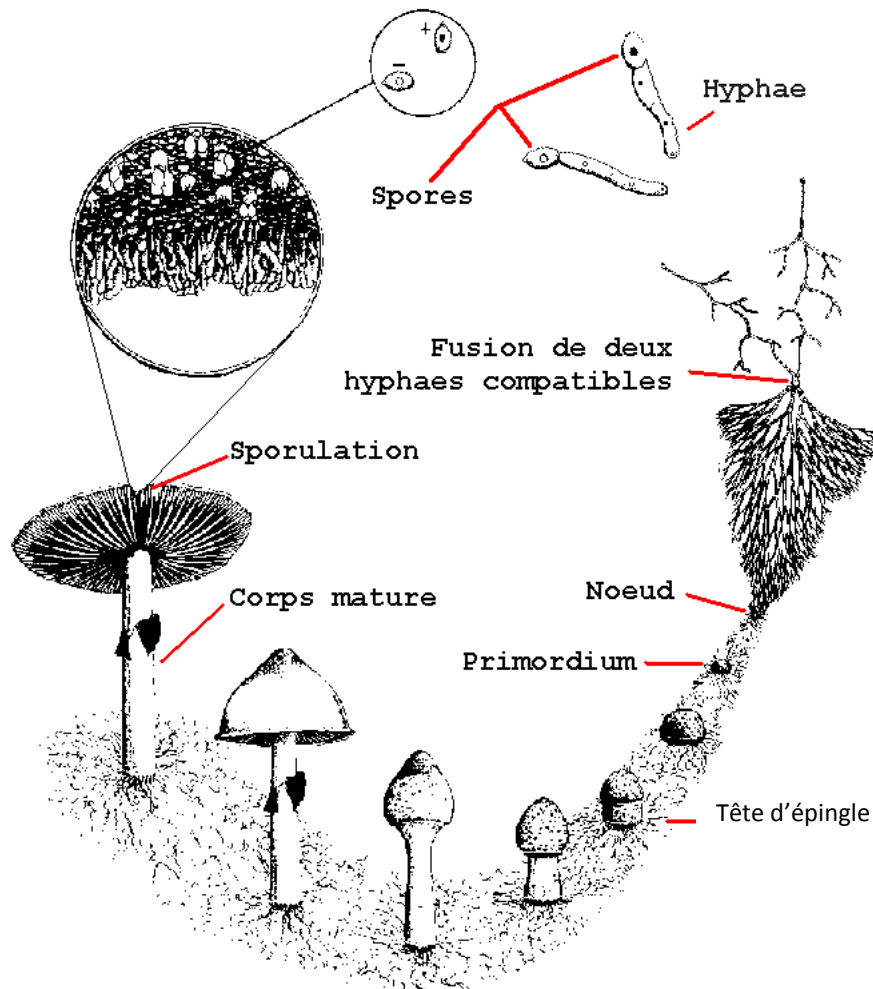


Figure 2. Cycle de vie des agarics

<http://champignonscomestibles.com/wp-content/uploads/2011/10/cycle-de-vie-du-champignons-150x150.gif>

I-2. L'espèce *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach.

I-2.1. Morphologie

Agaricus bisporus possède un pileus rond, dont la largeur oscille entre 4 et 6 cm, d'un blanc velouté qui va se tacher d'ocre ou de brun. Le chapeau est attaché au pied par un voile secondaire quand il est jeune (on n'aperçoit pas ses lamelles). L'ouverture de ce voile libère ainsi un petit anneau. En vieillissant, le chapeau va s'aplatir. La cuticule est blanche avec des écailles bien différenciées et des lamelles blanchâtres au début et couleur café à la fin. Ces lamelles sont serrées et libres avec un bord de ton plus clair. Le pied est cylindrique de 3-4 cm de longueur et sa surface est fibreuse, squameuse avec l'anneau en position médiane. Les basides sont majoritairement bisporiques et leurs spores ovales. Leurs cistides

sont claviformes. Il a aussi une texture (chair) ferme, et est épais, de couleur blanchâtre et une légère saveur de noix (Figure 3).



Figure 3. Corps fructifères d'*A. bisporus*
(Photos J. Guinberteau, INRA)

I-2.2. Cycle de reproduction

A. bisporus présente un cycle biologique caractéristique qui le différencie du reste des basidiomycètes.

Il possède un système d'incompatibilité sexuelle unifactoriel multi-allélique (Miller and Kananen 1972), le locus *MAT* ayant 14 allèles (Kerrigan *et al.* 1994, Imbernon *et al.* 1995), et son cycle de vie est amphithallique, c'est à dire qu'il est pseudohomothallique (= homothallic secondaire) ou hétérothallic, en fonction du niveau de ploïdie des spores qui peuvent être respectivement hétérocaryotiques ($n+n$) ou homocaryotiques (n) (Lange 1952, Kühner 1977). Trois variétés se distinguent par le mode de reproduction : *A. bisporus* var. *bisporus*, *A. bisporus* var. *burnettii* et *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* (Figure 4).

Les individus de la variété *bisporus* possèdent un système de reproduction sexuée pseudo-homothallique prédominant (ou homothallique secondaire). Le mycélium est fertile avec des spores pour la plupart hétérocaryotiques ($n+n$) et plus de 80% des basides sont bisporées. Il y a donc fécondation par intramixie au sein de la variété *bisporus* (Callac *et al.* 1993). Après germination, ces basidiospores génèrent un mycélium secondaire, capable de fructifier. Le fait qu'il ne produise que très peu de spores mononuclées haploïdes capables de créer des mycéliums monocaryotiques, pourrait conduire à une faible variabilité génétique dans les populations naturelles. En effet ce cycle particulier occulte la phase d'hybridation entre mycéliums homocaryotiques possédant un fond génétique différent et complique les hybridations dirigées pour l'amélioration génétique de l'espèce par les sélectionneurs.

Les individus de la variété *burnettii* possèdent un système de reproduction sexuée hétérothallique prédominant. Les spores sont pour la plupart homocaryotiques (n) et plus de 80% des basides sont tétrasporées. Il y a restauration de la fertilité après anastomose entre deux mycéliums homocaryotiques sexuellement compatibles. Il y a donc inter-fécondation ou autofécondation au sein de la variété *burnettii*.

Les individus de la variété *eurotetrasporus* possèdent un système de reproduction homothallique prédominant. Le mycélium est fertile avec des spores homocaryotiques (n) et plus de 80% des basides sont tétrasporées. Les souches de cette variété sont infertiles avec les autres souches (Callac *et al.* 2003).




	Hétérothallisme	Pseudo-homothallisme	Homothallisme
Spore	(n)	($n+n$)	(n)
Mycélium	Homocaryotique Stérile	Hétérocaryotiques Fertile	Homocaryotiques Fertile
Plasmogamie	(n)+ (n)► ($n+n$)	no	no
Sporophore	($n+n$)	($n+n$)	(n)
Baside			
Nombre spores de chaque baside	4 (or more)	3	2 (or 1)
Type de basides	85%-14%-1%	1%-18%-81%	2,3 ou 4
Cycle de vie d' <i>A. bisporus</i>	Hétérothallisme prédominant	Pseudo-homothallisme prédominant	Homothallisme
Distribution	Désert de Californie (var. <i>burnettii</i>)	Amérique et Europe	Europe

Figure 4. Représentation schématique des cycles de vie d'*A. bisporus*. Les spores hétérocaryotiques ($n+n$) reçoivent deux produits méiotiques compatibles. Les spores homocaryotiques de souches hétérocaryotiques produisent un mycélium qui est stérile (Callac *et al.* 1993). Durant la plasmogamie et après l'anastomose deux mycélium primaires homocaryotiques et sexuellement compatibles produisent un mycélium secondaire hétérocaryotique. Les trois pourcentages donnés pour le type de baside sont le pourcentage moyen de basides produisant respectivement, quatre spores ou plus, trois spores et une ou deux spores (Callac *et al.* 1996).

I-2.3. Contexte écologique

Agaricus bisporus est un champignon saprophytique humicole, autrement dit un décomposeur secondaire des litières de feuilles qui intervient donc dans les successions microbiennes après l'activité des décomposeurs primaires. Ainsi, dans la nature, *A. bisporus* est généralement trouvé associé avec les fumiers de cheval, les déchets agricoles, sur des pelouses, dans les litières forestières d'arbres des genres *Cupressus*, *Picea*, et *Prosopis* (Callac, 1994; Kerrigan, 1995). Ce champignon pousse à l'état naturel au début de l'été ou en automne sous les climats tempérés comme en France, beaucoup de souches sauvages ont été isolées en Europe, dans la région méditerranéenne, et en Amérique du Nord. L'aire de répartition géographique connue d'*A. bisporus* s'étend de la région boréale de l'Alaska (Geml *et al.* 2008) au climat équatorial du Congo (Heinemann 1956) et de dunes côtières à des montagnes culminant à plus de 3000 m d'altitude (Callac, communication personnelle). Cependant très peu de souches vivantes issues de milieux extrêmes sont disponibles dans les collections.

I-2.4. Biodiversité et ressources génétiques disponibles

I-2.4.1. La faible diversité génétique des cultivars

Les souches d'*A. bisporus* cultivées à travers le monde proviennent toutes d'un même pool limité de souches et la base génétique de tous les hybrides actuels est très similaire. Les génotypes de 75 souches cultivées fournies par les producteurs de mycélium entre 1990 et 2005 et conservées dans l'azote liquide ont été étudiés avec 14 marqueurs microsatellites (Foulongne *et al.* 2011a). Six groupes de souches ont été identifiés ; ils correspondaient aux lignées ancestrales connues et aux hybrides. Parallèlement, Sonnenberg *et al.* (2011) ont montré avec 600 marqueurs SNPs distribués sur tout le génome que 9 hybrides blancs commercialisés actuellement étaient tous identiques au premier hybride produit dans les années 1980, HU1. Ces études traduisent l'étroite variabilité génétique parmi les souches cultivées qui ont pu être obtenues à partir d'isolats monospores issus des cultivars et hybrides originaux. Cela a pu donner des différences phénotypiques observées par les producteurs, mais résultant d'un même fond génétique.

I-2.4.2. Une source de diversité génétique dans le germoplasme d'*A. bisporus*

Depuis les années 1980, plus de 800 souches sauvages d'*A. bisporus* ont été collectées et conservées dans deux collections principales, l'ARP (*Agaricus* Resource Program) aux Etats Unis d'Amérique, et la CGAB (Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux) en France (Callac *et al.* 2002). Leur diversité génétique a été étudiée à l'aide de différents types de marqueurs moléculaires (Horgen et Castle, 2002). A titre d'exemple, avec 33 marqueurs microsatellites utilisés sur un échantillon de 20 souches sauvages, Foulongne *et al.* (2009) ont observés un plus fort polymorphisme génétique qu'entre 7 cultivars représentant les groupes ancestraux et l'hybride à l'origine de toute la variabilité génétique des souches cultivées. Ceci démontre le potentiel des souches sauvages pour réintroduire de la variabilité génétique. L'étude a aussi démontré que les souches sauvages originaires de France présentaient de plus fortes similitudes avec les cultivars que d'autres souches. Ces résultats confirment des travaux antérieurs qui tendaient à montrer, à partir de marqueurs mitochondriaux, que les cultivars sont probablement issus d'une population ancestrale native d'Europe (Xu *et al.* 1997).

Dans le germoplasme, cinq populations majeures qui semblent isolées entre elles sur le plan de la reproduction ont été définies (Kerrigan 2004) : 3 en Amérique du Nord (Côte Californienne, Désert du Sonoran, ouest canadien), une au Moyen Orient, une en Europe. La population du Désert du Sonoran est la population d'origine de la variété *burnettii*. Dans la population européenne, la sous population de Grèce peut être distinguée sur le plan génétique, bien qu'elle conserve les caractéristiques européennes (Callac *et al.* 2002).

A un niveau plus local des populations distinctes sur le plan génétique peuvent aussi être définies. Une étude fine sur deux sites de récolte distants de 450 Km et sur deux années consécutives a montré que les flux de gènes sur une longue distance sont probablement très limités (Xu *et al.* 2002). Par ailleurs, les cas de clonalité végétative repérés ont été très peu nombreux et une forte diversité génétique était maintenue localement. Les zones couvertes par un seul génotype ne dépassaient pas une surface de 1 m².

Cependant des hybridations entre des cultivars porteurs des caractéristiques des populations européennes et des souches sauvages américaines ont été démontrées au sein de la population de la côte Californienne (Kerrigan *et al.* 1998). D'autres populations comme celle d'Alberta (Canada) sont par contre très faiblement contaminées par les génotypes de type cultivars.

II- Agaricus bisporus, une production agricole alimentaire aux propriétés intéressantes

II-1. Valeur nutritionnelle d'*A. bisporus*

Les champignons ont été consommés et appréciés tant pour leur saveur que leurs valeurs économiques et écologiques et aussi leurs propriétés médicinales depuis des siècles. En général, les champignons contiennent 90 % d'eau et 10 % de matière sèche (Morais *et al.* 2000; Sánchez, 2004). Ils ont une composition chimique qui est attractive du point de vue nutritionnel (Gbolagade *et al.* 2006; Dundar *et al.* 2008, 2009 ; Sadler, 2003).

Les champignons contiennent aussi des vitamines et une abondance d'acides aminés essentiels (Sánchez, 2004). Les constituants caractéristiques des nutriments d'*A. bisporus* sont : les protéines ($1,8 \pm 0,07$ à $2,1 \pm 0,12\%$) qui représentent jusqu'à 35% en base sèche, puis les fibres ($1,98 \pm 0,16\%$ p/p en base humide, soit 33,2% en base sèche) ce qui correspond aux valeurs notées pour les profils de fibres solubles et insolubles de $5,5 \pm 0,33$ et $27,83 \pm 3,31\%$. L'analyse des profils des sucres générés à partir d'hydrolyses acides montrent une fraction d'hydrates de carbone, constituée de glucose, galactose, mannose, xylose et ribose. Les acide-aminés principaux sont : la leucine et la méthionine (Osorio et Salamanca, 2009). Ce champignon contient aussi une quantité important d'ergosterol, qui après une exposition à l'irradiation d'UV est converti en vitamine D2 (Koyyalamudi *et al.* 2009). On remarque la présence d'ergotionéine, un antioxydant présent jusqu'à un niveau 12 fois plus important que dans le germe du blé. On note aussi des vitamines remarquables comme la thiamine (B1) avec 4,2 mg/100g, la niacine : 43,1 ; la riboflavine (B2) 4,10 ; ou l'acide ascorbique (C): 43,2 mg/100g.

II-2. Une alternative dans la production d'aliments :

La mondialisation affecte la production d'aliments et leur consommation forme une chaîne dans le monde. Les consommateurs de nombreuses régions obtiennent continuellement une plus large variété de produits alimentaires de qualité supérieure et à plus bas prix. Dans ce contexte, de nombreux produits alimentaires se concurrencent les uns les autres pour attirer les consommateurs.

Une des réussites techniques obtenue durant les dernières décades est celle de la culture commerciale des champignons comestibles qui s'est étalée dans le monde entier. Leur culture est un processus biotechnologique par recyclage de déchets organiques

lignocellulosiques, de là son importance écologique, car cette activité s'appuie sur l'utilisation et le recyclage accéléré de millions de tonnes de sous-produits agricoles, agro-industriels et forestiers utilisés comme substrat de culture (Chang, 1999; Kües et Liu, 2000; Chang et Miles, 2004 ; Sobal *et al.* 2007). Ils pourraient devenir de plus en plus importants pour les fermiers qui cherchent une valeur ajoutée pour leur produits et une façon de compléter leur revenu agricole en se servant de sous-produits ou des coproduits d'autres récoltes (Fewell et Gustafson, 2007).

Tableau 1. Valeur nutritive de champignon de Paris

Macronutriments

/ 100 g	Quantité
Kcal	22
Hydrates de carbone (g)	3,1
Protéines (g)	3,3
Graisses (g)	0,3
Graisses saturées (g)	0,05
Fibres	1

Micronutriments

Vitamines			% AJR**
Vitamine B2 (riboflavine)	Mg	0,4	29
Vitamine B3 (niacine)	Mg	3,6	23
Vitamine B5 (acide pantot)	Mg	1,5	25
Acide folique*	µg	30	15
Minéraux			
Potassium	Mg	318	16
Cuivre	Mg	0,3	32

Béatrice de Reynal, NutriMarketing pour ANICC – Audit champignon 2009

* AFSSA, www.afssa.fr/TableCIQUAL/index.htm

AJR: Directive 2008/100/EG

En général, la culture des champignons comestibles représente une technologie de faible coût parce que les déchets lignocellulosiques de l'agriculture peuvent être convertis ou transformés en un aliment de haute qualité nutritionnelle pour l'homme, résultat qui a été obtenu au cours de décennies d'expérimentation. Cela pourrait être le seul processus qui combine la production de nourriture riche en protéines avec la réduction de la pollution de l'environnement (Beetz et Kustudia, 2004). La production des champignons est considérée comme la seconde et la plus importante technologie microbienne commerciale devant celle des levures (Pathak *et al.* 2009).

II-3. Production au niveau mondial, latino-américain et mexicain

II-3-1 Production mondiale d'*A. bisporus*

Les nécessités alimentaires et l'accroissement de la population mondiale ont généré de nouvelles alternatives de production et de consommation de champignons. Actuellement il y a approximativement plus de 1 000 variétés de champignons comestibles sur le marché mondial (Tableau 1), mais moins de 20 espèces sont largement utilisées comme nourriture et seulement 8 à 10 espèces sont régulièrement cultivées en quantités significatives. Parmi eux : *A. bisporus*, *A. bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus* sp. *Auricularia* sp. *Volvariella volvaceae*. Actuellement, la production mondiale dépasse les 7 millions de tonnes de champignons comestibles frais cultivés par an, dont la valeur économique approximative dépasse les 30 billions de dollars. Le taux moyen d'accroissement annuel de leur production est supérieur à 11%. C'est le plus important en fonction des volumes de production car entre les années 1965 et 1997 leur production totale a été multipliée dans le monde par plus de 18 fois, de 350,000 tonnes en 1965 à presque 6, 160,800 tonnes en 1997.

Tableau 2. Le nombre d'espèces de champignons sauvages comestibles et médicinaux

Catégorie	Nombre d'espèces	Total en pourcentage
1. Comestible seulement	1 009	43
2. Comestible et médicinal	88	4
3. Alimentation seulement	820	35
4. Alimentation et médicinal	249	11
5. Médicinal seulement	133	6
6. Autres usages (aucun des susdits)	29	1
TOTAL espèces sauvages utiles	2 327	
TOUT comestibles seulement (1+2)	1 097	
TOUTE alimentation (3+4)	1 069	
TOUT médicinal (2+4+5)	470	

Source : <http://www.fao.org/docrep/009/y5489f/y5489f05.htm>

La plus grande partie de cette augmentation est arrivée pendant les 15 dernières années. La production des champignons cultivés a augmenté dans un grand pourcentage (Vetter et Berta, 2005). La production de champignons en 2009 a été estimée à 4 680 726 tonnes en Chine (le principal producteur de champignons comestibles), à 369 257 tonnes aux États-Unis, à 235 000 tonnes aux Pays-Bas, à 117 934 tonnes en France, à 136 000 tonnes en

Espagne, à 176 569 tonnes en Pologne, à 105 000 tonnes en Italie, à 77 017 tonnes au Canada, à 57 747 tonnes en Irlande et à 45 000 tonnes au Royaume-Uni (FAOSTAT 2009; USDA 2009).

Agaricus bisporus représente près de 40% de la production et de la consommation mondiale de champignons. La Chine, Les Etats-Unis, La Hollande, La France, et La Pologne, sont les principaux producteurs. En Argentine, en Colombie et au Mexique la demande et l'offre ont augmenté. Ces aliments sont reconnus bénéfiques pour la santé par les consommateurs d'aujourd'hui. La qualité finale d'*A. bisporus* est influencée par différents facteurs parmi lesquels l'état et le développement des fructifications et les conditions de pré et post-récolte (Osorio et Salamanca, 2009). Pendant l'année de production 1979, *A. bisporus*, a représenté plus de 70% de la production mondiale. De plus il existe une large distribution des zones de culture. Ces dernières années, sa production a subi une augmentation importante dans le monde. (Sánchez, 2010). La Chine, en produit environ 3, 772,623 tonnes/an ce qui représente 65% de la production mondiale. (FAOSTAT, 2008).

La statistique des groupes divers autour de l'Union Européenne, des Etats-Unis et de l'Australie ainsi que de la FAO a montré une large augmentation de la demande de champignons, et du nombre des consommateurs qui recherchent de plus en plus des avantages supplémentaires en matière de santé en plus de leurs qualités culinaires.

L'industrie des champignons a un rôle prééminent dans l'économie de beaucoup de pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique. Après la Chine et les Etats Unis, les Pays Bas ont la production de champignon de Paris la plus importante, dont une grande partie est exportée. Malgré l'énorme potentiel de la culture des champignons comestibles, leur importance commerciale et leur haute valeur économique, l'investissement dans la recherche sur les processus physiologiques et biochimiques de ces organismes, dont la compréhension est fondamental pour développer leur croissance, a été relativement bas (Matthijs, 2005). Ces connaissances sont fondamentales et nécessaires pour maintenir et, ou augmenter à la fois le commerce des champignons comestibles et pour aider à explorer de nouveaux espaces pour leur culture.

II.3.2. Production d'*A. bisporus* en Amérique Latine

La production commerciale d'*A. bisporus* a été initiée en Amérique, aux États-Unis à la fin du XIXe siècle. En Amérique Latine, elle a été initiée au Mexique en 1933 près de la ville de

Mexico. Le Mexique est le producteur le plus important puisqu'il est responsable de 50 % de la production totale de l'Amérique Latine.

En 1970, l'Amérique Latine produisait à peine 2000 tonnes par an d'*A. bisporus*. Mais l'échange technologique entre l'Amérique du Nord et l'Europe, de même que l'ouverture de marchés internationaux a fait passer la production en 1996 à plus 40 000 tonnes (Lahmann, 2008). En 2002 la production estimée a été de 59 674 tonnes ce qui correspond à 7 % de ce qu'a été produit par l'Union Européenne (846 900 tonnes en 2004 (anonyme)) et à 15% de la production des Etats-Unis (AEPC, 2002).

Selon Martinez-Carrera *et al.* (2007), le montant annuel des opérations relatives aux champignons comestibles au Mexique dépasse les 200 millions de dollars et a généré autour de 25 000 emplois directs et indirects. La consommation par personne au Mexique pour 2007 a été de 0,562 Kg grâce à l'adaptation favorable des technologies, aux conditions du pays, à un début de consommation, à une consolidation et à un développement du marché de champignons frais et en boîte et à la formation de ressources humaines.

Cependant au Mexique, la production à moyenne et à plus grande échelle reste limitée à de grandes entreprises nationales et transnationales. Un des problèmes auxquels sont confrontés les petits producteurs intéressés par sa culture est le coût élevé de production. Ce coût est lié à l'investissement nécessaire pour contrôler la température pendant la culture, du fait du climat chaud dans une très grande zone de la République Mexicaine durant de nombreux mois de l'année.

II-4. La situation actuelle du secteur agricole au Mexique et la production de champignons comestibles

Le secteur agricole mexicain a fait face à des transformations profondes durant les trois dernières décennies. Le processus continu d'urbanisation, une intense globalisation et les transformations démographiques ont configuré un nouvel environnement pour le secteur agricole (Escalante *et al.* 2005 et 2007), qui est caractérisé par des changements technologiques. Ils sont notoires dans les améliorations de la productivité et dans les nouvelles cultures qui s'adaptent aux exigences d'un marché international. Nous explorons des modifications génétiques qui améliorent les variétés des produits. Des nouveaux schémas organisationnels dynamisent les formes de commercialisation et modifient les méthodes d'insertion sur le marché mondial et de plus incluent la mise en place de nouveaux schémas de développement rural (Escalante *et al.* 2000 ; Ibarra et Acosta, 2003).

D'une manière générale, la production des champignons à petite échelle représente une bonne opportunité pour des fermiers intéressés par une activité supplémentaire et une option pour ceux sans beaucoup de terre (Beetz et Kustudia, 2004). Dans ce contexte, l'avenir de l'industrie des champignons au Mexique est positif, ceci dû au changement dans la perception des habitudes alimentaires mais cette industrie nécessite une planification et une structuration appropriée pour maintenir un niveau de demandes en croissance et de profits intéressants. La production de champignons comestibles est une activité significative puisqu'au Mexique, elle a annuellement généré un peu plus de 25 000 emplois directs et indirects, uni à l'importance écologique de cette activité économique, qui réside à l'utilisation et le recyclage de plus de 474 000 tonnes par an de sous-produits agricoles, agroindustriels et forestiers.

Les informations ci-dessus mettent en évidence l'importance du champignon de Paris (*A. bisporus*) et aussi pourquoi des efforts de recherche pour adapter sa culture aux conditions mexicaines sont soutenus.

II-5. La culture du champignon de Paris en régions chaudes

Le champignon de Paris est cultivé commercialement sur un compost préparé à partir d'un mélange de fumier de cheval, paille de blé, fientes de volailles et gypse (Figure 5), lequel est soumis à une vaste procédure de fermentation aérobie, le compostage (Gerrits, 1974). Les exigences nutritionnelles basiques d'*A. bisporus* sont, en principe, facilement rencontrées dans le compost (Wood et Fermor, 1985). Le but de la procédure de compostage est de préparer un milieu qui favorisera la croissance des champignons au détriment d'autres microorganismes (Fermor *et al.* 1985). Dans le système de production moderne, le compost est produit en grande quantité par des usines de compostage qui réalisent ensuite l'opération d'inoculation et de mise en place sur de grands containers. *A. bisporus* colonise le compost en 14 à 17 jours. Cependant, les mécanismes biologiques et chimiques responsables de cette sélectivité sont en grande partie inconnus (Straatsma *et al.* 1989 ; Smith *et al.* 1995). Après l'achèvement du processus de compostage, le compost est constitué principalement des composants tirés des plantes (lignine, cellulose, hémicellulose), de protéines et d'une importante biomasse microbienne (Fermor et Wood, 1979). La fraction de lignine et la cellulose sont liées chimiquement à l'hémicellulose (Cullen and Kersten, 1996).

Après le compostage, des grains de seigle recouverts de mycélium d'*A. bisporus* (le blanc) sont introduits dans le compost pour la phase d'incubation. Le compost colonisé est alors recouvert d'une couche de terre de gobetage pour la phase de fructification.

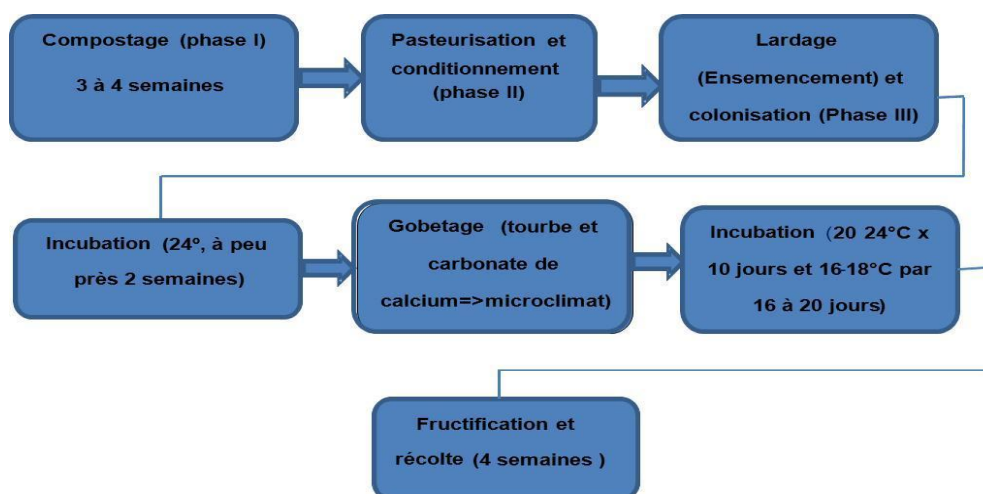


Figure 5. Production d'*A. bisporus*. (Photo prise à Fungo-ff)

Cette terre de gobetage est composée de tourbe mélangée avec du calcaire et contient une microflore naturelle nécessaire à la fructification. Finalement, après colonisation complète du compost, le développement des corps fructifères commence. Les mécanismes à la base de l'initiation des corps fructifères et du développement ultérieur des corps fructifères matures ne sont pas entièrement compris et maîtrisés (Figure 6). Une série de paramètres abiotiques incluant la température, la concentration de CO₂, l'humidité et le pH ont été démontrés comme influent l'initiation des corps fructifères (Flegg and Wood, 1985).

A. bisporus est en effet un champignon mésophile au niveau du mycélium (température optimale : 24-25°C) mais il requiert des basses températures pour fructifier (16-17°C) parce que la température élevée limite ou annule le développement des sporophores. Ainsi *A. bisporus* est largement cultivé dans de nombreux pays du monde. Cependant, il n'a pas pu l'être dans des pays tropicaux et subtropicaux sans de lourds investissements dans des chambres climatisées nécessaires à sa culture.

Figure 6. Processus de culture de champignon de Paris



Dans les pays d'Amérique Latine et spécifiquement au Mexique, la température moyenne maximale quotidienne est fréquemment supérieure à 30°C de mars à octobre et quelque fois la température maximale quotidienne en août et septembre atteint 36°C et plus. Pour cultiver *A. bisporus* à bas coût, on doit pouvoir le faire pousser entre 25 et 30°C et de plus, il doit avoir une capacité à tolérer le stress lié à des plages à plus haute température, par exemple 36°C durant plusieurs heures dans une journée.

Une solution pour rendre la culture d'*A. bisporus* accessible à des petits et moyens producteurs dans des pays avec un climat subtropical ou tropical, et éviter les investissements lourds et les fortes dépenses d'énergie, serait d'utiliser une souche capable de réaliser son cycle de vie complet en étant constamment exposée à des températures supérieures ou égales à 25°C. Cette souche devrait conserver des capacités de rendement et une qualité compatibles avec les exigences des marchés.

De telles souches ne sont pas disponibles actuellement et doivent être recherchées en exploitant la biodiversité disponible dans le germoplasme de l'espèce.

B- Adaptation des champignons à la température

B-I- La température affecte le développement des champignons :

I-1. Température et évolution/adaptation

La température est l'un des facteurs de croissance le plus important qui gouverne l'adaptation et la spéciation des organismes dans une large gamme d'ambiances, avec les combinaisons des conditions abiotiques et les interactions biotiques. Les organismes ont des combinaisons variables complètes des traits morphologiques qui satisfont l'espèce pour sa survie dans un habitat particulier (Bowers, 1994). Ils développent des mécanismes endogènes pour affronter des changements environnementaux comme la haute température. Leur croissance et leur production de biomasse sont fortement affectées par les chocs thermiques causant des dommages aux fonctions des cellules des tissus, et parfois même à l'organisme entier.

Une des conséquences de ces effets est écologique. La température limite les distributions de certaines espèces (Stevens et Fox, 1991; Hoffmann et Watson, 1993; Clarke 1996) et de la même façon la niche fondamentale d'une espèce (Cooper *et al.* 2001) ; parce que autant la chaleur extrême que le froid peuvent défavorablement affecter le métabolisme et les traits de vie (Hochachka et Somero, 1984; Cossins et Bowler, 1987; Prosser 1991; Ingraham et Marr, 1996). Par ailleurs, plusieurs changements physiologiques importants qui impliquent l'expression différentielle de diverses protéines (par exemple, la réponse au choc thermique) ont aussi été montrés comme étant associés au changement de la température (Herendeen *et al.* 1979; Gross, 1996; Ingraham et Marr, 1996 en Cooper *et al.* 2001).

De tels effets devraient mener à l'optimisation de traits métaboliques et démographiques sur la gamme la plus fréquente de températures expérimentée par une population; si cette gamme est étroite, alors la spécialisation thermique peut se développer (Cooper, 2001). Cette hypothèse présume un échange évolutif fréquent entre la capacité à tolérer une large gamme de températures et le fonctionnement optimal sur une gamme étroite, mais cet échange manque de support empirique (Huey et Hertz, 1984).

La température est donc un des paramètres physiques les plus importants dans l'évolution. Il définit les propriétés fondamentales d'une espèce et joue un rôle important dans beaucoup de mécanismes physiologiques complexes (Chen et Shakhnovich, 2010). Beaucoup

d'expériences de laboratoire ont été effectuées pour étudier les aptitudes de réponse au stress causé par une température ambiante élevée (Bennett et Lenski, 1997, 2007). Dans le cas des bactéries, les expériences ont montré que les niches thermiques pour *Escherichia coli* et d'autres bactéries sont asymétriques entre l'extrémité haute température et l'extrémité basse température (Cullum *et al.* 2001 ; Travisano et Lenski, 1996). Cela signifie que, bien que les bactéries qui se sont adaptées aux températures environnementales plus hautes puissent facilement survivre aux températures inférieures sans sacrifier trop d'aptitudes. En général, les aptitudes baissent brusquement quand la température se situe au-dessus de l'optimale.

Bien que des études (Xia, 1995 ; Ratkowsky *et al.* 2005) aient apporté l'idée d'une relation entre la température ambiante, la taille du génome et les aptitudes des organismes, ces modèles utilisent souvent un grand nombre de paramètres ajustables ou non, pour expliquer le rapport fondamental entre le comportement d'adaptation thermique asymétrique d'un organisme et les propriétés physiques de ses protéines.

Donc, basé sur leur modèle évolutionnaire moléculaire précédent pour lequel tous les gènes essentiels doivent satisfaire à la condition de stabilité minimale pour la survie d'un organisme, Zeldovich *et al.* 2007 présentent un modèle qui peut expliquer l'adaptation de procaryotes dans une large gamme d'environnements thermiques. Leur modèle explique la raison physique de l'existence de l'asymétrie de niche thermique et le manque de différence évolutive. Il fournit aussi une relation quantitative entre le nombre de protéines contrôlant le processus de reproduction dans un organisme (G), l'enthalpie d'activation (ΔH^\ddagger) et la réponse d'aptitudes à températures environnementales élevées ou diminuées. (Chen et Shakhnovich, 2010).

I.2. Température d'incubation et métabolisme des cellules

La température d'incubation est un facteur primordial pour le métabolisme et la croissance des cellules. L'élévation de la température provoque une augmentation de l'énergie cinétique moyenne, ce qui fait que les forces de cohésion qui existent entre les particules ne peuvent pas maintenir la structure qu'elles avaient et en conséquence, les réactions biochimiques à l'intérieur de la cellule s'accélèrent. Les facteurs structurels qui ont été étudiés pour expliquer l'adaptation des organismes thermophiles incluent une augmentation de liaisons hydrogène des protéines thermostables (Berezovsky et Shakhnovich, 2005 ; Robinson-Rechavia *et al.* 2006) une augmentation de la fréquence de paires d'ions et des contributions électrostatiques dans les protéines thermostables (Greaves et Warwicker,

2007; Yano et Poulos, 2003 ; Vogt *et al*, 1997 ; Capistran-Licea *et al.* 2009) ainsi qu'une augmentation de la quantité de certaines liaisons apolaires (Coleman et Sharp, 2010). Cependant, au-dessus d'une certaine température, tant les protéines que les acides nucléiques, perdent leur structure tridimensionnelle ; phénomène connu comme une dénaturation (Fernandez *et al.* 2003).

La réponse de croissance des champignons à la température est variable, mais de nombreux dégradateurs du bois et des litières sont majoritairement mésothermes ; ils ont des températures de croissance minimale, optimale et maximale respectivement autour de 5, 25, 40°C. Les champignons basidiomycètes cultivés, se placent dans ces fourchettes. Par exemple, pour *Lentinula edodes*, aucune croissance n'est possible à partir de 30°C, alors que *Volvariella volvaceae* supporte des températures de 35°C. Deux autres espèces d'*Agaricus* sont cultivées à échelle significative en plus de *A. bisporus*, *Agaricus bitorquis* et *Agaricus subrufescens*. Leurs points de température létale ont été estimés entre 35° et 38°C (Güler et Arkan, 2007 ; Llarena-Hernandez *et al.* 2011), Ces deux champignons sont considérés comme d'origine tropical (Zhao *et al.* 2011). *A. bisporus* est un agaric tempéré, avec un optimum de température de 30°C. Des différences entre dégradateur de bois tempérés et tropicaux ont été soulignées par Magan (2008), évoquant une possible tolérance à des températures plus élevées des champignons tropicaux par rapport à leurs équivalents tempérés. Il y par contre peu de travaux sur des différences intra-spécifiques pour des champignons qui peuvent être trouvés à la fois en région tropicale et tempérée, comme par exemple *A. suburfescens*. Bien que nous ne disposions pas de souches d'*A. bisporus* d'origine tropicale stricte dans le germoplasme, des souches provenant de zones à climats contrastés existent et pourraient être des sources d'adaptation à la température. Le thermophilisme chez les champignons se réfère à des espèces qui ne croissent qu'entre 20 et 50°C ou plus (Magan, 2008). Donc les espèces ou souches de basidiomycètes saprophytes qui présentent des optima de température élevés ne peuvent pas être qualifiées de thermophiles puisqu'elles poussent aussi à des températures inférieures à 20°C.

I.3. Conditions de stress de la cellule

Le stress thermique est défini comme l'augmentation de la température au-delà d'un seuil pendant une période de temps suffisante pour causer un dommage irréversible à la croissance d'un organisme en développement. Une élévation transitoire, en général de l'ordre de 10 à 15°C au-dessus la température ambiante est considérée comme un stress de chaleur. Cependant, le stress de température est une fonction complexe de l'intensité (la

température en degrés), de la durée et du pourcentage d'augmentation de la température (Peet and Willits, 1998).

Une hausse de température modérée peut induire celle de l'organisme seulement après une très longue exposition. Les dégâts directs incluent la dénaturation des protéines ou leur agrégation et l'accroissement de la fluidité des lipides de la membrane. Des dégâts indirects associés avec la température incluent l'inactivation d'enzymes dans les chloroplastes et les mitochondries (plantes), des inhibitions dans la synthèse de protéines, dans la dégradation des protéines et la perte de l'intégrité de la membrane (Howarth, 2005).

Le stress à haute température est un des facteurs les plus cruciaux qui limitent la croissance et la productivité d'organismes vivants (Frova, 1997; Wahid et Shabbir, 2005). Les organismes vivants répondent au stress à haute température par des changements métaboliques.

Chez des basidiomycètes lignicoles, des températures extrêmes (<10 ou > 40 °C) ou des stress thermiques peuvent induire des augmentations dans la production des enzymes ligninolytiques et d'anion superoxydes (Fink-Boot *et al.* 1999).

I-4. Température et fructification

Le développement des tissus fructifères des champignons correspond à une succession d'évènement de différenciation cellulaire en réponse aux interactions entre leur programme génétique interne avec des facteurs physicochimiques externes et/ou des signaux chimiques de l'environnement ou des autres régions de la structure en développement (Moore *et al.* 2008).

La température est l'un des facteurs importants pour certains champignons, comme *A. bisporus*. Ce sont en générale des baisses de température qui contribuent à l'effet inducteur de la fructification. Pour d'autres espèces, comme *A. subrufescens*, la reproduction de cycles journaliers de température a été préconisée, mais cependant des études récentes montrent que la fructification peut être obtenue sans variation de la température (25°C) depuis la phase de colonisation du substrat (Llarena-Hernandez *et al.* 2011). Une consultation de fiches produites de Mycelia et Italspawn, producteurs de blanc (semence de champignon), montre que les indications associées aux souches d'*A. bisporus* qu'ils commercialisent sont une température de l'air au maximum de 19°C, avec un minimum de 16 à 18 °C. Pour

certaines souches brunes, la plage de température est descendue à 14-17 °C. La température à l'intérieur du compost doit être comprise entre 19 et 21°C, suivant les souches.

Chez *A. bisporus*, comme chez d'autres eucaryotes, la différenciation cellulaire ou la défense contre les parasites est corrélée avec une augmentation transitoire des niveaux de dérivés réactifs d'oxygène (DRO) dans les cellules (Savoie, 2008). Ces variations du potentiel redox intracellulaire pendant un stress oxydatif régulent des facteurs de transcription et par conséquent l'expression de divers gènes est modulée. Certains de ces DRO, comme l'H₂O₂ sont des messagers intracellulaires qui peuvent aussi être transmis aux cellules voisines, car ils traversent les membranes cellulaires (Takemoto *et al.* 2007). La température, mais aussi la lumière visible, des variations de pH du milieu, l'osmolarité, la pression partielle d'oxygène ou encore les concentrations de substrat, le dessèchement, des dégâts mécaniques, et autres facteurs externes qui influencent la croissance mycélienne et le développement, induisent la production de DRO dans les cellules fongiques (Belozerskaya et Gessler 2007). Ces facteurs sont ceux sur lesquels nous agissons avec l'utilisation de la terre de gobetage et les modifications des conditions climatiques pour induire la fructification dans les cultures d'*A. bisporus*. Nous pouvons donc nous attendre à ce que l'adaptation à une température de fructification supérieure à 25°C soit associée avec des modifications dans les systèmes de production ou dégradation de DRO, ou alors dans leurs conséquences sur des facteurs de transcription spécifiques.

B-II- La thermo-tolérance des champignons :

La thermo-tolérance est un caractère complexe que est le résultat de l'optimisation de divers processus physiologiques et biochimiques complets tant au niveau cellulaire qu'à celui des différentes étapes de développement. Dû à cette nature complexe et à une interaction forte phénotype-ambiance, le caractère montre une hérédité faible et il est difficile de le mesurer, de manière que la classification des génotypes comme tolérants ou susceptibles de l'être est souvent incertaine. La base génétique du caractère est presque inconnue bien qu'on considère qu'un grand nombre de gènes peuvent être impliqués. Les travaux ont été surtout conduits chez les plantes, mais nous pouvons estimer qu'ils sont applicables aux champignons.

II-1. Les deux types de thermo-tolérance : la basal et l'acquise

La tolérance aux hautes températures a deux composantes : la thermo-tolérance basique ou constitutive, due à l'adaptation évolutive thermique à l'habitat et la thermo-tolérance acquise due à l'acclimatation (par exemple, la capacité de survivre à des températures létales après une exposition à un choc de chaleur douce (Burke, 2001 ; Klueva *et al.* 2001 ; Maestri *et al.* 2002).

Diverses études ont montré qu'une plante acclimatée survivra quand elle est exposée à une température qui serait mortelle pour une plante non acclimatée (Hong *et al.* 2003). Ceci est un aspect principal de la réponse à l'acclimatation, nommé thermo-tolérance acquise qui implique l'expression des gènes sensibles au stress. Le rôle de ces gènes est de maintenir l'homéostasie à des niveaux biochimiques et moléculaires durant le stress (Hahn et Li, 1990). La tolérance thermique acquise est un processus actif par lequel une quantité considérable de voies métaboliques des organismes sont déviés dans leur structure et dans leur fonctionnement pour éviter l'effet préjudiciable causé par l'augmentation de la température.

Comme la thermo-tolérance est un trait multigénique, la variabilité génétique dans la tolérance basique et acquise doit être évaluée en utilisant des approches différentes. Des études ont donné des preuves que la variabilité génétique en réponse au stress entre génotypes du blé est principalement due à l'expression différentielle de gènes sensibles de stress. Ces études ont identifié des corrélations entre l'acquisition de la thermo-tolérance, la synthèse et l'accumulation de protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins ou HSPs), quoique les mécanismes qui sont à la base de la tolérance thermique ne soient pas encore complètement compris (Burke, 2001; Maestri *et al.*, 2002 ; Senthil-Kumar *et al.* 2007).

L'acquisition de thermo-tolérance semble dépendre non seulement de la synthèse de HSPs, mais aussi de leur localisation cellulaire (Lin *et al.* 1984; Chou *et al.* 1989; Heckathorn *et al.* 1999; Korotaeva *et al.* 2001). Trois observations renforcent cette hypothèse :

- (a) l'induction de HSPs a été caractérisée comme une réponse extrêmement rapide et intense,
- (b) l'induction de HSPs indique que l'organisme est soumis à une condition de stress et,
- (c) la synthèse de HSPs est corrélée à l'induction de tolérance à la température dans une large variété de cellules et d'organismes (Parsell et Lindquist, 1993).

II-2. La tolérance croisée

La tolérance croisée (tolérance accros), aussi connue comme la protection croisée, est la capacité d'un agent stressueur à augmenter transitoirement la tolérance ou la résistance d'un organisme à un deuxième agent stressueur hétérologue (facteur de stress d'une nature différente). En général, en augmentant l'ampleur ou la durée du facteur de stress préliminaire, on augmente la tolérance du stress ultérieur. Cependant, une fois que l'agent stressueur préliminaire atteint une certaine ampleur, les organismes exigent une période de rétablissement entre les deux facteurs de stress pour développer la tolérance au stress.

De plus, la variation semble être substantielle parmi des organismes dans le timing et la durée de la réponse, bien que le phénomène de tolérance croisée semble être présent dans divers groupes d'organismes. Quoique les mécanismes sous-jacents à la tolérance croisée ne soient pas entièrement compris, on pense que les protéines de choc de chaleur (Hsps), particulièrement les Hsp70, peuvent être impliquées (Kampinga *et al.* 1995; Sabehat *et al.* 1998, Todgham *et al.* 2005). Dans des environnements naturels, les organismes éprouvent rarement un seul facteur de stress. Plus généralement, ils éprouvent simultanément des stress multiples ou successifs. Donc, il est possible que la cross-tolérance soit une caractéristique critique de la réponse au stress cellulaire dans la nature.

II-3. Les mécanismes de tolérance au stress

La plupart des organismes ont développé des mécanismes de tolérance pour échapper aux conditions environnementales défavorables, basés sur la synthèse et l'accumulation de composés organiques protecteurs, comme le saccharose, le glycogène et le tréhalose (Thevelein, 1984; Arguelles, 2000; Fillinger *et al.* 2001). En effet, le tréhalose a été annoncé comme une partie de l'adaptation physiologique aux divers stress abiotiques dans des levures et des moisissures filamenteuses (Plesofsky-vig et Brambl, 1993; Singer et Lindquist, 1998a, b; Fillinger *et al.* 2001; François et Parrou, 2001; Elbein *et al.* 2003).

Le Tréhalose se trouve dans une variété d'eucaryotes et des organismes procaryotes (Elbein, 1974; Jorge *et al.* 1997; Singer et Lindquist, 1998 a.b), y compris dans des moisissures filamenteuses appartenant aux basidiomycètes (Gancedo et Flores, 2004; Bois *et al.* 2006). En premier tréhalose, a été considéré comme une source d'énergie pour des cellules, mais des études postérieures ont démontré qu'il était aussi important dans d'autres processus métaboliques, principalement, quand les organismes sont exposés dans des conditions de croissance défavorables (Singer et Lindquist, 1998a, b; Fillinger *et al.* 2001). Dans

Saccharomyces cerevisiae il a été observé quand des cellules ont été exposées au choc thermique (Argüelles, 1997; Fillinger *et al.* 2001).

Quelques études ont cherché à déterminer le mécanisme de protection cellulaire par le tréhalose pendant des conditions de stress, par exemple; dans la stabilisation d'enzymes intracellulaires et la prévention de l'accumulation de protéines dénaturées (Singer et Lindquist, 1998a, b; Fillinger *et al.* 2001; Francois et Parrou, 2001; Elbein *et al.* 2003). Le tréhalose agit aussi comme un stabilisateur de membranes cellulaires pendant des conditions de stress (Patist et Zoerb, 2005).

Le Tréhalose et l'activité de la tréhalase peuvent être impliqués comme un mécanisme supplémentaire dans le développement de thermo-tolérance chez *Pisolithus* sp. En réponse au choc de chaleur à 42°C, une accumulation de tréhalose intracellulaire et une augmentation de tréhalase dans la masse mycélienne du champignon ont été observées, quand on les a comparées au traitement de contrôle (28°C). En culture in vitro, les essais ont montré que le tréhalose avait un effet protecteur sur l'activité B-glucosidase sous stress thermique. (Ferreira *et al.* 2007). Shirasaka *et al.* (2006) ont examiné l'effet du tréhalose sur la tolérance à la chaleur du mycélium de *Lentinula edodes* et ont montré que le tréhalose était efficace contre le traitement thermique (40°C).

Les membranes forment une structure qui isole les cellules et permettent une compartimentation aux cellules eucaryotiques. Ce ne sont pas de simples barrières passives qui protègent l'intérieur de la cellule mais elles sont impliquées dans les réponses et la modulation intracellulaire. De récentes données montrent que l'expression de nombreux gènes (particulièrement ceux qui réagissent aux changements de température) sont influencés et, ou contrôlés par l'état de la membrane (Vigh *et al.* 1998).

Beaucoup d'activités cellulaires essentielles dépendant de la structure de la membrane, c'est-à-dire, sa composition lipidique (en particulier la quantité d'acides gras insaturés), et la dynamique lipidique de la membrane a reçu une attention significative (Vigh *et al.* 1998).

Les membranes ont des propriétés de fluidité qui permettent à la cellule de percevoir les changements de température, de pH, d'osmose et de changements de pression atmosphérique, etc. Des changements brusques peuvent causer des modifications de la structure de la membrane et en conséquence la perte de certaines fonctions physiologiques. Cependant, après un changement de température, les cellules compensent ce stress cellulaire induit à travers des mécanismes physiologiques et biochimiques, d'homeoviscosité ou d'adaptations homeophasiques qui leur permettent de maintenir un équilibre

homéostatique. La croissance à basse température, par exemple, cause un ou plusieurs changements dans cette composition, incluant une augmentation dans l'insaturation des acides gras, des changements dans les types de lipides. Chacun de ces changements permet à la membrane de remodeler son organisation et la propriété dynamique de ses lipides. Les activités de beaucoup d'enzymes et d'autres éléments associés à la membrane changent aussi.

II-4. Les mécanismes de thermo-tolérance d'*A. bisporus*

Les mécanismes de thermo-tolérance évoqués ci-dessous doivent probablement intervenir chez *A. bisporus*. En effet les sporophore du champignon sont riches en tréhalose, et un gène de HSP70 nommé *hspA* (Genbank X98508) a été identifié dans une étude de transcriptomique comparative de mycélium et sporophores (Ospina-Giraldo et al. 2000). Des mesures de l'expression de ce gène dans des souches d'*A. bisporus* tolérantes et sensibles à un pathogène fongique, *Lecanicillium fungicola*, ont montré que les souches tolérantes présentaient des niveaux supérieurs de transcrits dans les primordia qui représentent le stade réceptif au pathogène (Largeteau et al. 2010). Ceci suggère un rôle dans la tolérance au stress biologique et laisse penser que *hspA* puisse aussi être impliqué dans la thermo-tolérance.

Par ailleurs, Wang et al. (2004) ont isolés des fragments de gènes associés à la thermotolérance du mycélium végétatif d'une souche particulière d'*A. bisporus* grâce à de la DD-RT-PCR pour analyser l'expression différentielle de gènes dans du mycélium maintenu à 25 °C et du mycélium subissant une augmentation brusque de la température à 32°C pendant 12 h. Ils ont ainsi identifié trois gènes de thermo-tolérance et publié la séquence complète de l'ADN du gène 028-1 (GenBank DQ235473) (Chen et al. 2005, 2008). Après avoir construit un vecteur d'expression binaire, le gène d'*A. bisporus* a été transféré dans une souche non thermotolérante, par transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Huit des 10 transformants obtenus ont poussé à 34 °C, comme la souche thermotolérante, alors que la souche sauvage n'a pas poussé (Chen et al. 2009). Cependant, que ce soit dans les transformants ou la souche donneuse, les vitesses de croissances à 34°C n'étaient que de 15 à 25 % celles mesurées à 28°C. Malgré cela ce gène est le seul connu dans cette espèce qui ait été associé à la thermotolérance.

D'autres gènes associés aux structures lipidiques membranaires ou au maintien de l'équilibre redox dans les cellules fongiques sont aussi des candidats intéressants pour leur

implication éventuelle dans la thermo-tolérance d'*A. bisporus*, mais ils n'ont pas été étudiés dans cet objectif jusqu'à présent.

C- Génomique et génétique d'*A. bisporus*

C-I- Génotypes et phénotypes:

I-1. Phénotype

On considère le phénotype comme le produit de l'information génétique et l'environnement. Ainsi, on peut expliquer des différences dans le phénotype par les variations des conditions environnementales, mais aussi les différences phénotypiques peuvent refléter une variation génétique accumulée en raison de la perturbation du flux des gènes entre des populations et leur spéciation ultérieure, c'est-à-dire leur distinction en espèce biologique nouvelle (Prada *et al.* 2008).

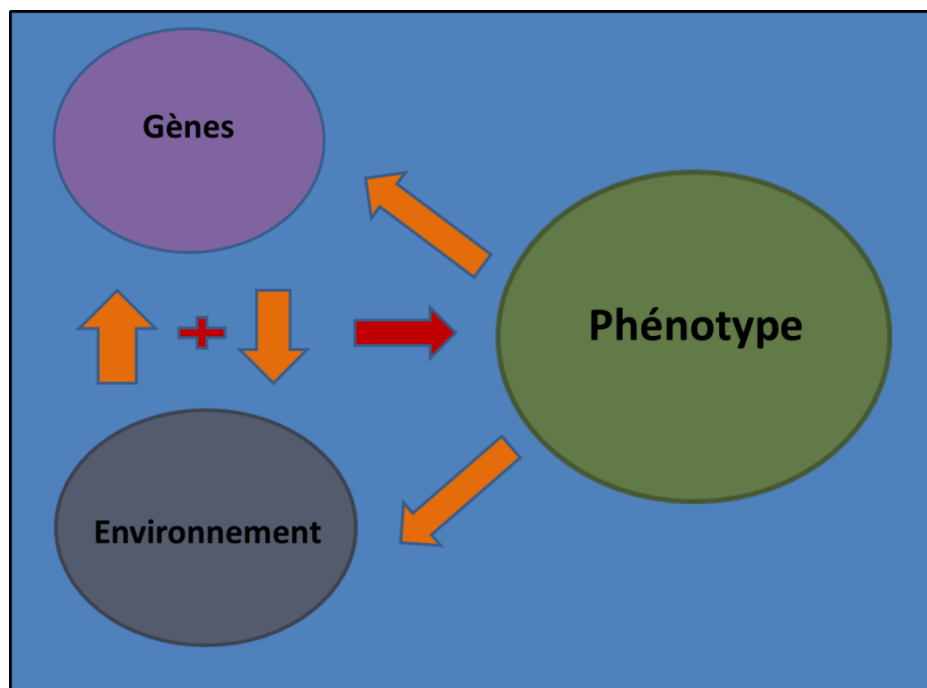


Figure 10. Relation gènes et environnement = phénotype.

I-2. Plasticité phénotypique : caractéristiques et avantages

À part son rôle sélectif dans le filtrage de la variation interindividuelle, pendant l'évolution par la sélection naturelle, l'environnement joue aussi un rôle important dans la production de la variation durant le développement. Des facteurs environnementaux externes peuvent influencer des taux liés au développement et/ou des trajectoires et mener à la production de phénotypes distincts du même génotype. Cela peut aboutir à un meilleur échange entre le phénotype adulte et l'environnement sélectif et représente ainsi une solution potentielle de problèmes posés par la fluctuation environnementale.

Ce phénomène est appelé la plasticité liée au développement adaptatif. L'étude de la plasticité intègre des disciplines différentes, notamment l'écologie et la biologie du développement. Elle analyse les éléments à tous les niveaux d'organisation biologique : la régulation moléculaire, les changements du développement de l'organisme, la variation des phénotypes et des aptitudes dans les populations naturelles (Beldade *et al.* 2011).

Ainsi, la plasticité phénotypique est la tendance d'un génotype particulier à produire des phénotypes différents sous différentes conditions environnementales à partir de son ontogénie (Thibert-Plante et Hendry, 2010). La plasticité phénotypique est très commune dans la nature (DeWitt et Schneiner, 2004) et souvent semble être adaptative (Sultan, 2000; Pigliucci, 2001). C'est-à-dire que la plasticité phénotypique permet aux organismes de s'adapter à des environnements imprévisibles en changeant leur phénotype pour mieux convenir aux conditions locales. Elle est opposée à la spécialisation génétique qui éliminerait cette option.

Thibert-Plante et Hendry (2010) ont trouvé aussi, que la plasticité adaptative se développe aisément en présence de dispersion entre des populations d'environnements écologiques différents. Cette plasticité promeut la colonisation de nouveaux environnements, mais réduit la divergence génétique entre eux. Ils ont constaté aussi que l'évolution de plasticité peut améliorer ou dégrader le potentiel pour la sélection divergente de former des barrières reproductives.

Si la plasticité est exprimée après la dispersion, les barrières reproductives sont généralement plus faibles parce que la plasticité permet aux espèces migratoires d'être mieux protégées sous leur nouvel environnement. Si la plasticité est exprimée avant la dispersion, les barrières reproductives ne sont ni affectées ni améliorées. En général, la

plasticité phénotypique peut fortement changer le processus de spéciation écologique et devrait être considérée en étudiant l'évolution de barrières reproductives.

La plasticité phénotypique augmente la survie et le succès reproducteur d'individus, contribuant à leur capacité à faire face aux changements environnementaux et potentiellement à s'adapter à de nouvelles niches. La plasticité est une propriété émergente du génotype agissant sur la sélection naturelle (Pigliucci, 2005). Les différences morphologiques peuvent être une réponse aux facteurs exogènes mais aussi elles peuvent être attribuées aux différences génétiques accumulées en raison de la perturbation de flux de gènes parmi des populations.

L'étude faite par Prada *et al.* 2008, sur un organisme marin clonal, met en évidence l'importance de définir correctement l'espèce, parce qu'inconsciemment l'utilisation de complexes d'espèces peut surestimer la distribution géographique, l'abondance de population et la tolérance physiologique.

Il est possible chez certains organismes d'étudier la variabilité de l'expression phénotypique d'un même génotype appelée plasticité phénotypique qui est mesurée par sa norme de réaction. La norme de réaction d'un génotype est la gamme des phénotypes produits par un même génotype lorsque celui-ci est soumis à des conditions environnementales différentes. Pour un même caractère, la forme de la norme de réaction peut être variable entre génotypes ce qui est la conséquence des interactions génotype-environnement. Schématiquement, on peut représenter ces interactions par 3 types de graphes où sont tracées les normes de réactions de 2 génotypes G1 et G2 (Figure 11):

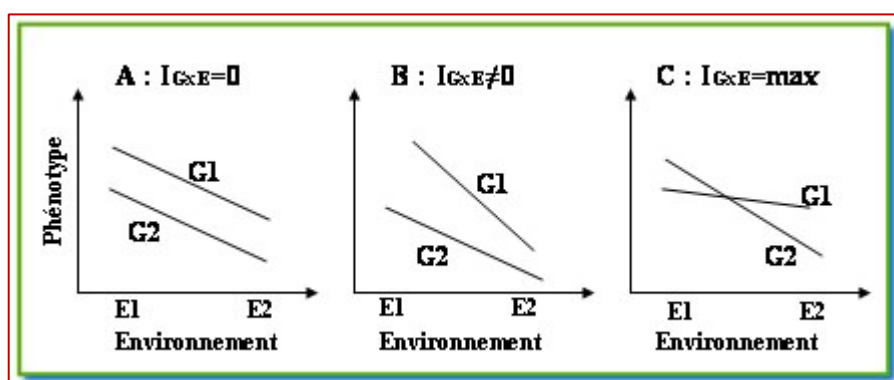


Figure 11. Schéma qui montre trois types de graphes d'interactions : génotypes-environnement. G= Génotype ; E= Environnement. (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/par14.htm>).

- Le graphe A représente l'absence d'interaction GxE. Les 2 génotypes répondent de la même façon aux variations de l'environnement. Cela n'empêche pas un effet de l'environnement sur l'expression phénotypique du caractère, qui est représenté par la pente des droites.
- Le graphe B représente l'existence d'interaction GxE. La différence entre les 2 génotypes est plus importante dans l'environnement E1 que dans l'environnement E2. Le génotype G1 a cependant toujours une plus forte valeur du caractère quel que soit l'environnement considéré.
- Le graphe C représente une interaction GxE maximale. Il y a inversion des valeurs phénotypiques des 2 génotypes entre les environnements E1 et E2. Le génotype G1 a une plus forte valeur du caractère dans l'environnement E2 alors que c'est l'inverse dans l'environnement E1. Notez qu'il existe des conditions environnementales particulières où la variabilité génétique ne s'exprime pas au niveau phénotypique (point d'intersection des droites). <http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/par14.htm>;

I-3. Les conséquences écologiques de la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est répandue dans la nature et implique souvent des caractères comportementaux, physiologiques, morphologiques et d'histoire de vie qui soient écologiquement appropriés. En conséquence, la plasticité change de nombreuses interactions entre des organismes et leurs environnements abiotiques et biotiques. Bien que beaucoup de travaux sur la plasticité se soient concentrés sur ces modèles d'expression et d'évolution, les chercheurs sont de plus en plus intéressés par la compréhension de savoir comment la plasticité peut affecter des modèles écologiques et des processus des niveaux divers (Miner *et al.* 2005).

La plasticité phénotypique peut être définie comme la production de phénotypes multiples à partir d'un génotype, selon des conditions environnementales (Bradshaw, 1965 ; Sultan, 2000). Il est maintenant clair qu'une large diversité d'organismes exprime une plasticité phénotypique en réponse aux aspects biotiques et abiotiques de leurs environnements (Karban et Baldwin, 1997 ; DeWitt et Schneiner, 2004). Ces réponses de plasticité incluent des changements du comportement, de la physiologie, de la morphologie, de la croissance, de l'histoire de la vie et de la démographie et peuvent être exprimés dans la durée de vie d'un individu seul (Young *et al.* 2003) ou à travers des générations (Agrawal *et al.* 1999).

C-II- Génétique d'*A. bisporus*

Les analyses du génome nucléaire d'*A. bisporus*, montrent que la population global est significativement subdivisée en régions avec hauts niveaux de diversité génétique dans la majeure partie des populations géographiques (Xu *et al.* 1998). Cette variabilité génétique a été évoquée plus haut (A-I-2-4). Elle a été étudiée grâce à l'identification et l'utilisation de marqueurs moléculaires adaptés.

II-1. Identification de marqueurs moléculaires chez *A. bisporus*.

Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés pour étudier la variabilité génétique des souches cultivées : isoenzymes (Royse et May 1982a), RFLP (Loftus *et al.* 1988), RAPD (Khush *et al.* 1992, Moore *et al.* 2001, Staniaszek *et al.* 2002), ISSR (Guan *et al.* 2008). Récemment Foulongne *et al.* (2009) ont obtenu des marqueurs moléculaires microsatellites co-dominants d'*A. bisporus*. Ils ont démontrés leur potentiel pour la caractérisation moléculaire de souches commerciales et l'identification des variations génétiques intra-spécifique Foulongne *et al.* (2011). De même, Sonnenberg *et al.* (2011) ont généré de nombreux marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) à partir de l'analyse du génome des deux homocaryon parentaux de l'hybride Horst U1 et ont sélectionné 600 marqueurs bien distribués sur l'ensemble du génome pour évaluer la diversité génétique des souches d'*A. bisporus*.

Des marqueurs moléculaires ont également été développés pour les besoins de la sélection génétique, l'objectif étant de mettre en œuvre la sélection assistée par marqueurs (SAM). Spear *et al.* (1983) ont créé la première carte génétique de liaison chez *A. bisporus* en utilisant des allozymes. Cependant, le faible nombre de marqueurs appropriés n'a permis d'obtenir qu'une carte très limitée. En ajoutant des marqueurs basés sur les séquences ADN, d'autres cartes génétiques de liaisons ont ensuite été développées. Par exemple, Moquet *et al.* (1999) ont utilisés 40 marqueurs dont 17 SCAR dérivés de séquences de fragment de RFLP ou de gènes publiés et des marqueurs RAPD pour proposer une carte comportant 5 groupes de liaison et compléter les travaux précédents de Kerrigan *et al.* (1993) et de Callac *et al.* (1997). Ce n'est qu'après plusieurs années de travaux pour développer des méthodologies adaptées pour obtenir des marqueurs moléculaires efficaces que Foulongne *et al.* 2010 ont publié la première carte génétique de liaison complète d'*A. bisporus*. Ils ont utilisé un peu plus de 325 marqueurs (231 AFLP, 21 microsatellites, 68 CAPS plus 3 loci liés à des caractères (mating type, nombre de spores par baside, couleur, et une alloenzyme (ADH) dans la construction de cette carte génétique de référence pour

l'espèce *A. bisporus* à partir de 118 homocaryons haploïdes dérivés d'un hybride inter-variétal : *A. bisporus* var. *bisporus* x *A. bisporus* var. *burnettii*. Ces marqueurs sont distribués sur 13 groupes de liaison représentant les 13 chromosomes d'*A. bisporus*. Cette carte génétique contribue à l'analyse de caractères quantitatifs et à la prise de décisions dans les programmes de sélection. En 2011, Foulongne *et al.* ont publié une seconde carte de liaison basée sur l'analyse de ségrégation d'une descendance d'un hybride de seconde génération. Pour augmenter le nombre de marqueurs ancre entre les deux cartes, des fragments AFLP ont été convertis en SCAR et nommés ACM (AFLP-converted markers). La carte génétique construite comprend 183 marqueurs (53 séquences polymorphiques amplifiées coupées, 16 SSR, 17 ACM, 96 AFLP et le locus de la couleur), distribué parmi 13 groupes de liaison (LG) et une couverture de 851 cM. Cette transposabilité entre cartes génétique souligne la faisabilité de la sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Tout récemment, Foulongne *et al.* 2012 ont examiné l'architecture génétique des caractères relatifs au rendement d'*A. bisporus* à travers de la cartographie de QTLs (loci de caractères quantitatifs), utilisant la deuxième génération de la descendance des hybrides issue d'un croisement entre une souche sauvage et une variété commerciale cultivée. Ils ont évalué aussi, le rendement global et intermédiaire, le poids moyen par champignon, le nombre de corps fructifères par m², la précocité et la couleur du pileus. Un total de 23 QTLs ont été détectés pour les 7 caractères liés au rendement. Les QTLs obtenus, expliquent entre le 21 % (le rendement de deux volées) et le 59 % (précocité) de la variation phénotypique. Les quatre régions de QTLs qui contrôlent le rendement, le poids moyen et le nombre de sporophores ont été détectés sur les groupes II, III, IV et X, suggérant un effet de pléiotropie ou un lien serré. Jusqu'à six QTLs ont été identifiés pour la précocité. Le locus PPC1, ensemble avec deux régions génomiques supplémentaires, ont expliquées plus de 90 % de la variation phénotypique de la couleur du pileus. Les Allèles du parent sauvage ont montré un apport bénéfique pour quelques traits du rendement. La résistance à la maladie de la môle sèche due au champignon *Lecanicillium fungicola* a aussi été analysée. Pour la majorité des QTLs détectés, l'allèle favorable pour la résistance vient du parent sauvage, mais pour quelques QTLs, l'allèle qui contribue à un haut niveau de résistance a été donné par la souche cultivée. La comparaison avec les QTLs pour les caractères liés au rendement a révélé cinq colocations entre loci de résistance et de rendement, suggérant que la résistance est le résultat de facteurs génétiques d'expression du fitness des souches. Ces travaux soulignent que le germoplasme sauvage est une source valable de variation pour plusieurs caractères agronomiques. Ils mettent aussi en lumière la complexité des structures génétiques liés à la performance de production de sporophores par *A. bisporus*.

II-2. Genome d'*A. bisporus*

Dernièrement, Morin *et al* 2012, ont présenté deux génomes d'*A. bisporus*, leurs gènes répertoires et des profils de transcription sur le compost et durant la formation du champignon. Le séquençage (Technologie Sanger) de H97 (homocaryon de l'Hybride HU1) a révélé 30,387,844 paires de bases. 92 marqueurs génétiques sélectionnés au long de 13 chromosomes ont été localisés sur la carte génétique du génome H97 pour valider l'ordre et l'orientation des 19 plus grands scaffolds (> 50 kbp). Le deuxième génome d'*A. bisporus* var. *burnettii*, souche JB137S8, a été séquençé en utilisant la technique de pyroséquençage et 454 Illumina.

Bien que cet article fondateur du séquençage du génome d'*A. bisporus* ait été orienté vers l'identification des mécanismes gouvernant l'adaptation à une niche écologique riche en matières humiques, les données de séquence et les annotations ouvrent de perspectives d'utilisation pour l'étude de nombreux autres caractères.

CHAPITRE 2

Chapitre 2

Diversité phénotypique d'*Agaricus bisporus* pour l'adaptation à des températures plus élevées que la condition standard de culture

INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à la présentation et l'analyse des résultats d'expérimentations de culture d'*A. bisporus* à petite et moyenne échelle, ainsi que de ceux de tests de croissance mycélienne radiales sur milieux gélosés.

Le premier objectif de ces travaux était d'identifier des souches présentant des optima ou maxima de température de croissance supérieurs à ceux des cultivars utilisés par les producteurs de champignon et d'analyser la variabilité de ces caractères en fonction des origines géographiques ou de l'appartenance des souches à l'une des trois variétés d'*A. bisporus*, à savoir la variété *bisporus*, la variété *burnettii* et la variété *eurotetrasporus*. Pour cela la richesse de la Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux (CGAB, INRA) a été exploitée. Le CGAB contient essentiellement des échantillons d'*A. bisporus* var. *bisporus* provenant d'Amérique du Nord et d'Europe. Cent unes de ces souches ont été prélevées au hasard dans la collection, et elles se distribuaient en 31 souches Nord-Américaines et 70 souches européennes. Nous avons ajouté un échantillon aléatoire de 10 souches d'*A. bisporus* var. *burnettii*, cette variété n'ayant été trouvée que dans une population isolée dans

le Désert de Sonoran aux Etats Unis d'Amérique. Pour *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*, nous avons introduit dans l'étude les deux seuls spécimens connus et disponibles, ainsi qu'un hybride naturel entre *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* et *A. bisporus* var. *bisporus*. Ces 114 souches ont été cultivées à petite échelle sur du compost commercial pour évaluer leur potentialité de formation de sporophores matures à 17°C et 25°C. Ces températures ont été choisies pour représenter la température moyenne conseillée pour les souches commerciales et une température significativement supérieure à 20 °C et qui correspond à celle majoritairement utilisée pour les *Agarics* tropicaux cultivés (voir Chapitre 1). En plus des origines géographiques et zones climatiques, des corrélations avec d'autres caractères comme la couleur et le nombre de spores par basides ont été recherchées. Les détails du matériel et méthode, les résultats et la discussion sont présentés dans l'article 1 :

Largeteau ML, Callac P., Navarro- Rodriguez AMP., Savoie JM. (2011). Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C). *Fungal Biology*, 115: 1186-1195.

Le second objectif de ce chapitre était de confirmer la faisabilité d'une production d'*A. bisporus* avec une température de 25°C et plus pendant la fructification en réalisant des expérimentations qui permettent d'évaluer le rendement et d'apprécier la qualité des champignons. Pour cela 8 souches présentant des caractéristiques intéressantes d'après les essais à petite échelle évoqués ci-dessus ont été cultivées dans un dispositif à moyenne échelle, en comparant leurs rendements à 17, 25 et 30°C. Les détails du matériel et méthode, les résultats et la discussion sont présentés dans l'article 2 :

Navarro P, Savoie JM, 2013. Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce significant yields of mushrooms at 25°C. *Revista Iberoamericana de Micología*. In Press. Disponible en ligne le 25 juin 2013. doi:pil: S1130-1406(13)00063-6. 10.1016/j.riam.2013.05.014.

Ces deux articles sont retranscrits dans les pages qui suivent et une conclusion reprenant les points principaux de l'ensemble est proposée ensuite.

Article 1- Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C).

INTRODUCTION

The button mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach is the premier cultivated edible mushroom and is consumed worldwide. In addition to its interest as a cultivated edible mushroom, *A. bisporus* is a model species to study leaf litter white rotting basidiomycetes. Questions on adaptation of natural populations to compete with antagonists or to grow on specific substrates as compost prepared for cultivation have been scarcely studied (Savoie *et al.* 1996). During two centuries, the button mushroom has been grown in caves at 14-16°C. Since the 1980's, climatic chambers replace caves, and cultivation conditions are standardised. A 16-19°C temperature is recommended during the fruiting period. Synchronisation of flushes may be improved by increasing the temperature to 21-25°C between flushes (Love *et al.* 1986). Although *A. bisporus* is the most cultivated edible fungus worldwide, its potential ability to fruit at higher temperature has received little attention except two studies. Mycelium thermotolerance was investigated by Wang *et al.* (2003, 2004). Humar and van Griensven (2000) observed that a 4°C increase in temperature induced macroscopic changes in primordium morphogenesis: fruiting bodies developed faster, the veil opened earlier, and spore shedding started before mushroom harvest. The mushroom cap size increased whilst its firmness decreased. Unfortunately, the authors gave no information on the strain reference and cultivation conditions used in their study. For a long while, lack of genetic resources have led to scarce investigations on the diversity of important traits such as the ability of *A. bisporus* to fruit at high temperatures than that commonly used for commercial cultivation.

Since the end of the 80's, two major collections, the ARP (*Agaricus* Resource Program, Kerrigan 1996) in the USA and the CGAB (Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux, Callac *et al.* 2002) at INRA-Bordeaux exist. They contain hundreds of wild isolates belonging to different varieties, and originating from various habitats and numerous geographic origins.

Three varieties of *A. bisporus* can be recognized by the average number of spores bear by their basidia and their life cycle. Amphithallism is a condition where both secondarily homothallism and heterothallism occur. Cultivars and most of the wild specimens belong to *A. bisporus* var. *bisporus* characterised by an amphithallic predominantly pseudohomothallic life cycle; correlatively, its basidia are mostly bisporic. In the two remaining varieties, basidia are mostly tetrasporic. *A. bisporus* var. *burnettii*, described for an isolated population of the Sonoran Desert of California, is amphithallic and predominantly heterothallic (Callac et al. 1993). *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*, described for a lineage of rare European specimens, is homothallic (Callac et al. 2003).

Agaricus bisporus is a humicolous saprophytic fungus that is rather rare in the wild but relatively well represented in certain substrates: in leaf/needle litter in forests, mainly of *Cupressus* (CA, USA; Mexico; continental Greece and Crete; Italy; France) but also of *Picea* (AB, Canada; WA, USA), under *Prosopis* and *Tamarix* in arid places (Sonoran Desert; CA, USA), in coastal dune (France), and on plant wastes and manure (UK, France, Russia, Portugal, ...) (Kerrigan 1995; Xu et al. 1997; Callac et al. 2002). Its known geographic range extends from the boreal region of Alaska (Geml et al. 2008) to the equatorial climate of Congo (Heinemann 1956) and from coastal dunes to mountains of above 3000 meters elevation. In light of this, adaptation of geographical populations and/or varieties of the species to different climates and habitats could be expected. To test this hypothesis, isolates chosen at random among populations representative of various geographic areas were screened for their ability to fruit at high temperature (25°C) compared with commercial practices. Our objectives were to better understand the adaptation of *A. bisporus* as a strain evolution trait toward climatic conditions, and to identify a reliable basis for genetic studies of the trait with a practical aim, reducing energetic costs during cultivation in hot countries as well as in temperate countries during the hot season.

MATERIAL AND METHODS

Study areas and isolates — *Agaricus bisporus* isolates were collected primarily through two organisations, Centre Technique du Champignon/INRA (CGAB collection, INRA Bordeaux-Aquitaine, France) and the Agaricus Resource Program (Kerrigan 1996). Isolates analysed in this study originated from sampled zones showing a wide range of latitude, elevation and climate. All the isolates were chosen at random among those in collection for each zone. A total of 73 isolates originated from Europe, and 41 isolates came from North America. Sampled sites are described in Table 1 and located on maps in Figure 1. Among the 114

isolates, 101 belong to var. *bisporus*, ten (CA5, Desert California) to var. *burnettii*, two (FR3 site 41, France, and FR2 site G2bis, Greece) to var. *eurotetrasporus*, and one (FR1 site 24, France) from a natural hybrid between var. *bisporus* and var. *eurotetrasporus* (Callac et al. 1993, 2003).

Table 1: Total sample of *Agaricus bisporus* isolates with reference to the geographical hierarchical level of the sampled sites, and to the habitat.

Country	State	Ref. in Fig 1A	Ref. in Fig 1B–D/zone	Site (ref. in Figs 1C and 2)	Habitat ^c	Isolate numbers
Canada	British Columbia	BC	— ^a	— ^b	G, M	2
	Alberta	AL	—	—	P, ?	5
USA	Washington	WA	—	—	P	1
	Idaho	ID	—/Kootenai county	—	Ps	1
	Colorado	CO	—	—	M	1
	California	CA	CA1, Coastal California	San Francisco (6)	Cm	1
				San Mateo (8, 13)	Cm	2
				Santa Clara (18)	P	1
			CA2, Coastal California	Santa Cruz (22)	G	1
				Santa Cruz (Davenport)	Cm	1
			CA3, Coastal California	San Luis Obispo	Cm	1
			CA4, Coastal California	—	?	1
			CA5, Desert California	Riverside	T	10
			CA6, Inland California	—	G, ?	2
	New Mexico	NM	—	—	MF	3
Mexico	Tlaxcala	MX	—	Cuapixtla, El Tejocote	Ch	8
Great Britain		GB	—	—	B-L	1
France		FR	FR1, Coastal Brittany (North)	Saint-Malo (24, 30)	Cm	3
			FR2, Coastal Brittany (South)	Lorient (31, 34, 36, 38)	Cm	6
			FR3, Coastal Charente	La Rochelle (41, 43, 55, 60, 70)	Cm	5
			FR4, Coastal Aquitaine	White dune (69, 72), Dune (80)	G	5
			FR5, Coastal Aquitaine	(64, 65)	Cm	2
			FR6, S–W Inland	(12, 6)	G	2
				(13, 14, 45)	M	3
			FR7, South Inland	—	?	1
			FR8, Inland	(2)	G	1
				(3)	P	1
				(5, 48)	B-L	3
				(8, 9)	M	2
				(N)	?	1
			FR9, S–E Inland	—	M	1
Spain		ES	—, Aragon (Nuades, Yosa lake)	—	Cs	2
Portugal		P	—, Alentejo	—	M	1
Greece		GR	GR1, Macedonia	Skaloti	M	1
			GR2, Thessalia	Mount Olympus (G16)	Cs	1
				Mount Olympus (G16bis)	M	1
				Papakosta (G17)	Cs	1
				Larissa (G1, G3, G7)	M	3
				Larissa (G2, G2bis, G12)	Cs	3
				Veletino (G6)	Cs	3
			GR3, Sterea Ellas	Gravia	Cs	1
			GR4, Peloponnesse	Kiparissi	Cs	1
			GR5, Isle of Evia	Rovies (G8), Limni (G9bis)	Cs	7
			GR6, Crete	Zourva	Cs	1
Hungary		HU	—, Mogyorod	—	?	1
Russia		RU	—, Penza	—	?	3
			—, Bryanskaya	—	?	2
Israel		IL	—, Coast	—	E	2

Ch = *Cupressus benthamii*; Cm = *Cupressus macrocarpa*; Cs = *Cupressus sempervirens*; E = *Eucalyptus*; G = *gramineae*; M = manure; MF = mixed montane forest; P = Picea, white Spruce forest; Ps = *Pseudotsuga*; T = thickets; ? = unknown.

^a Not in Fig 1B–D.

^b Not in Fig 2, and site unknown.

^c B-L = broad-leaved tree. Ch = ... unknown.

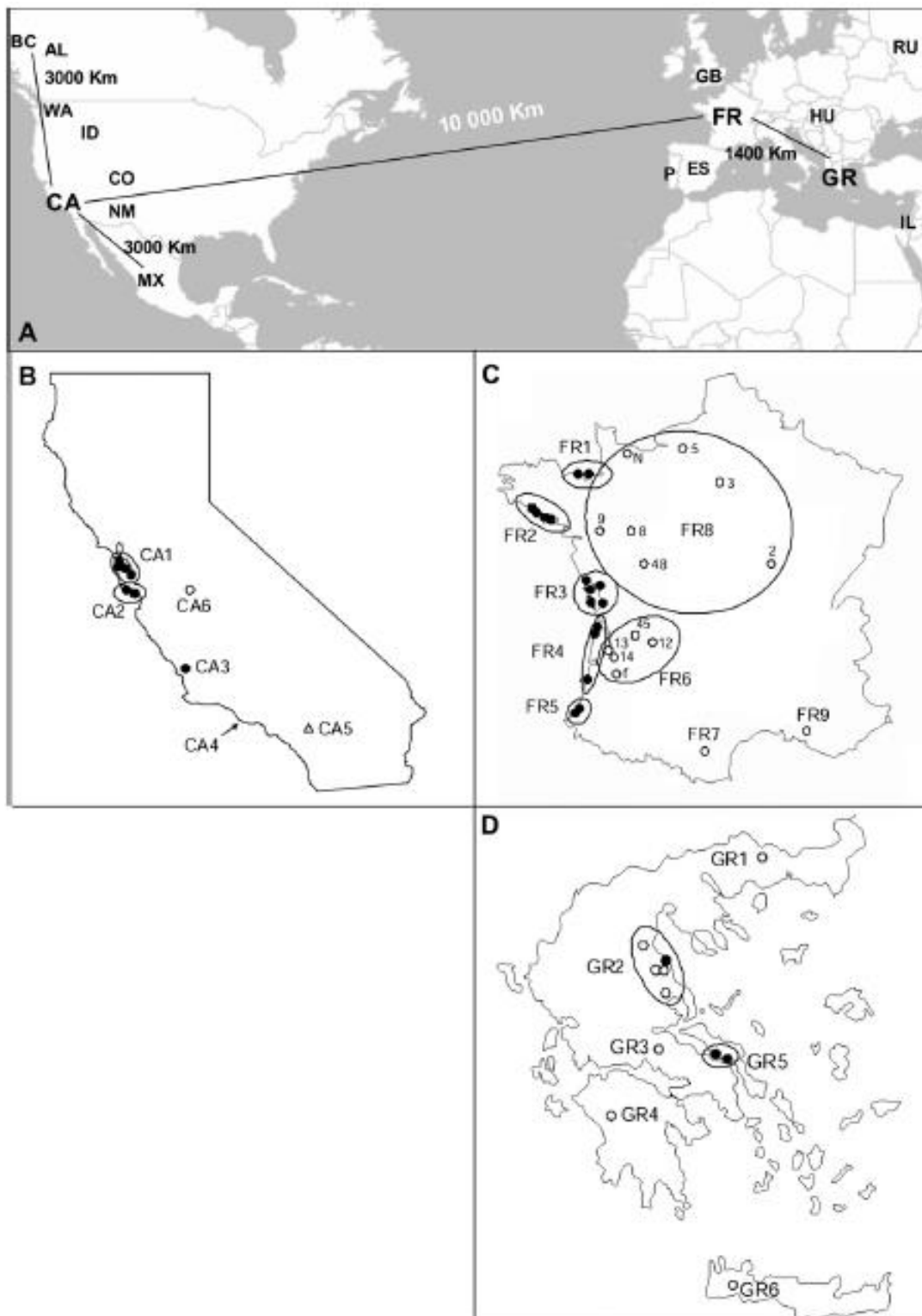


Figure 1: Geographical localisation of the sampled sites. North American and European countries and states with collect sites (A). Localisation of the Californian (B), French (C), and Greek sites (D), ● coastal, ○ inland, Δ desert site. See complement of information in Table 1 and Figure 2.

Fructification test — Small crates containing 500 g of commercial compost purchased from a mushroom grower (Renaud SA, Pons, France) were inoculated by covering the substrate surface with *A. bisporus* mycelium pre-cultivated on Cristomalt (10g l⁻¹) agar (15 g l⁻¹) medium. After incubation for 21 days at 25°C the cultures were covered with a standard casing layer and two treatments were immediately applied, 17°C and 25°C as fruiting temperature (Figure 2). In each 19 m³ climatic room, CO₂ was lowered by air flow (38 m³ h⁻¹). Relative humidity was maintained at 87-90% in the room set at 1 °C (treatment A), and 92-95 %, with the use of an additional humidifier, in the room set at 2 °C (treatment B). Four replicates were prepared, and yield data are mean values of the total numbers of mature sporophores produced per kilogram of substrate. Isolates able to produce mature sporophores at 25°C were called FHT⁺ isolates. The fructification level at 25°C was expressed as the percentage of the yield at 17 °C. The first picking day was recorded at each temperature. The date at 17°C was taken as reference (day 0) to calculate the fructification delay at 25 °C compared with 17°C.

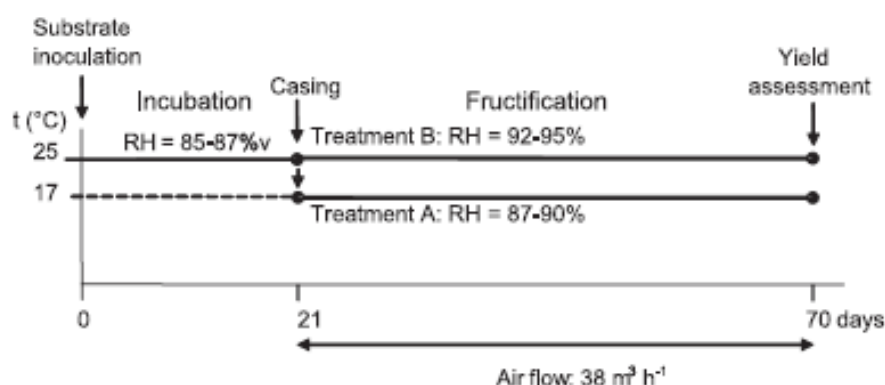


Figure 2: Environmental conditions (temperature, relative humidity, and air flow) during mushroom cultivation in the 19 m³ climatic rooms

Mycelial growth — Inoculum plugs (5 mm diameter) were removed from the edge of 15-day-old cultures and placed at the centre of Petri dishes filled with Cristomalt agar medium. The isolates were grown for 21 d at 18, 24, 30 and 33°C. Radial growth of each colony was periodically recorded on two perpendicular diameters. Data were means of three replicates.

Average Spore Number (ASN) — Counts of spore numbers per basidium were conducted with light microscopy for the two isolates of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*, the intervarietal hybrid, and 26 isolates randomly chosen in populations of *A. bisporus* var. *bisporus* from the French sites FR1, FR2, FR3, FR5, FR6, and FR8. At least 400 basidia (100 on each of two distinct lamellae removed from two different sporophores) were observed for each isolate.

The average number of spores per basidium was calculated (Callac *et al.* 1998). It can vary from from 2 (100 % bisporic sporophores) to 4 (100 % tetrasporic sporophores).

Data representation and statistical analyses. — The box-plot representation (Chambers *et al.* 1983) was used to show data distribution for the various parameters analysed. The box extends from quartile 25 (Q1) to quartile 75 (Q3). The horizontal line segment inside the box corresponds to the median (m). The higher and lower fractions are represented by line segments extending from the top and bottom of the box. Extra lines above and below the box show data found outside of the distribution (values $< [Q1-1.5(Q3-Q1)]$ and $> [Q3+1.5(Q3-Q1)]$). Data distributions were compared with the Cramer – Von Mises's non parametric test (Sprent 1989). Two distributions differed at $p=0.05$ for calculated $T>0.461$, and at $p=0.01$ for $T>0.743$. The Smirnov's test, generally less powerful, was applied when the Cramer – Von Mises's test result was near significance. A significant result with the Smirnov's test confirmed the tendency to differ revealed by the Cramer – Von Mises's test.

RESULTS

Table 2: Distribution of the FHT⁺ isolates in sampled locations

	<i>A. bisporus</i> isolates		
	Total numbers	FHT ⁺	
		Numbers	%
Europe	71	29	40.8
France	36	15	41.7
Greece	23	8	34.8
North America	41	28	68.3
Canada	7	4	57.1
Coastal California	8	5	62.5
Desert California	10	10	100
Mexico	8	5	62.5

Geographical and varietal parameters. — Considering all the sites, 41% of the isolates collected in Europe were able to fruit at 25 °C whilst FHT⁺ isolates represented 68% of the North American sample. All the 10 isolates originating from Desert California showed the FHT⁺ ability. Keeping apart these 10 isolates that belong to the variety *burnettii*, the percentage of FHT⁺ isolates in North America (61 %) was high compared with that observed in Europe (41 %). Similar percentages of FHT⁺ isolates were encountered among the French and Greek populations. Percentages recorded for the three North American populations

(Canada, coastal California and Mexico) were similar, but higher than those of the two European populations (Table 2).

The FHT⁺ ability showed no correlation with the latitude or elevation of the site (data not shown), and depended neither on the monthly average temperatures (minimal, maximal, diurnal amplitude) nor on the monthly average rainfall recorded for the sampled sites (Table 3 and Figure 3).

Table 3: Average temperature and rainfall recorded at six sampled sites (<http://meteo.fr.be.msn.com>).

	Annual average records for				Average records on FHT ⁺ collect month			
	Temperature (min./max, °C)			Rainfall (min./max., mm)	Temperature (°C)		Rainfall (mm)	
	Day	Night	Amplitude		Day	Night		
Larissa	10/33	1/18	8/15	13.2/37.9	Apr.	20	7	27.8
					Dec.	10	2	37.9
Lorient	9/23	4/14	5/9	30.3/78.9	Oct.	16	10	76.2
Penza	−6/26	−12/14	4/12	17.2/47.8	n.i. ^a	n.i.	n.i.	n.i.
Riverside	20/35	5/17	15/18	0/62.2	Jan. ^b	5	20	42.0
Rovies	12/28	8/22	4/7	2.4/51.0	Dec.	13	9	51.0
Tlaxcala	22/27	4/12	12/20	3/94.5	Jul.	24	11	86.3
					Aug.	24	11	76.2
					Oct.	24	9	32.7
a n.i. = no of information for the date of collect.								
b Information for one isolate out of ten.								

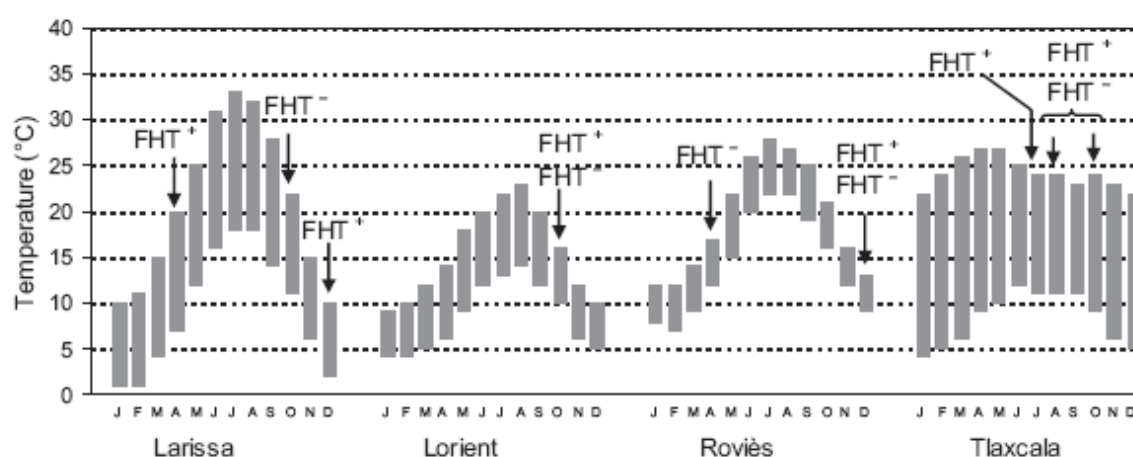


Figure 3: Average monthly temperature at four sampled locations and distribution of FHT⁺ and FHT⁻ isolates.

The geographical distribution of the FHT⁺ isolates in several sampling sites in France, Greece, coastal California (Figure 4) and in the Mexican site (8 isolates, 5 FHT⁺) showed that the FHT⁺ trait is not related to a site effect. Moreover, both FHT⁺ and FHT⁻ isolates were collected on a single day, on a single site (Table 4).

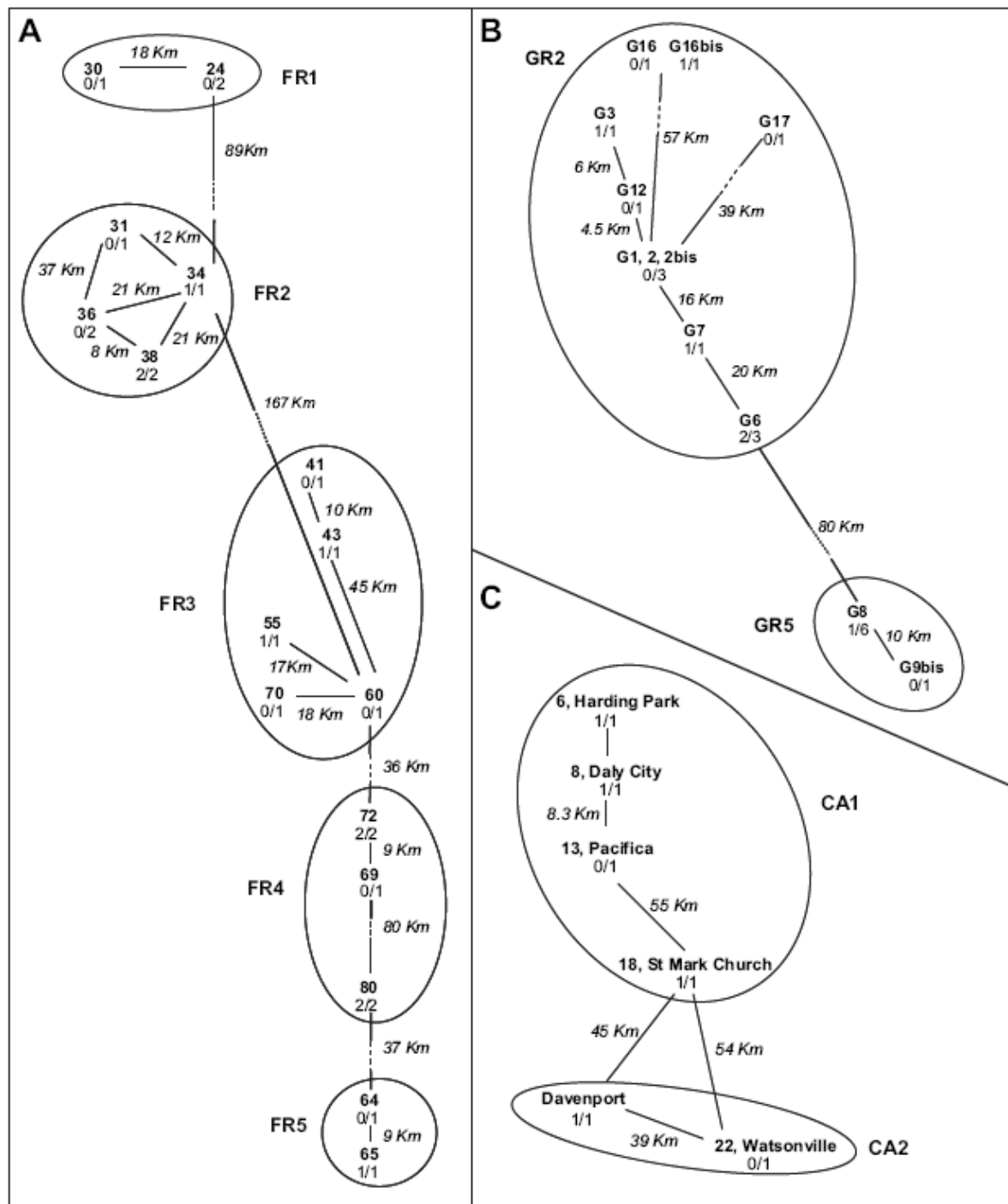


Figure 4: Sampled sites in coastal France (A), Greece (B), and coastal California (C) showing the distribution of FHT⁺ isolates. Site references (see Table 1) are mentioned in bold type, FHT⁺ number/total number of isolates in roman type. Distances in a straight line between sites are indicated in italic

Table 4: FHT⁺ ability in relation with the microclimate represented by the date of collect

			Isolate numbers	
			FHT ⁺	FHT ⁻
Mexico	El Tejocote	2002, Oct. 3	1	1
		2007, Aug. 29	2	1
Greece	G6	1999, Jan. 13	2	1
	G8	1998, Dec. 30	1	3

The *A. bisporus* isolates had been collected previously partly in wooded areas, partly in open areas (Table 1). All the isolates of var. *burnettii* grew under thickets. The two isolates of var. *eurotetrasporus* and the intervarietal hybrid had been collected under *Cupressus* spp. Percentages of FHT⁺ isolates in wooded and open areas were similar (45 and 48%, respectively) when the analysis was performed on the overall sample of *A. bisporus* var. *bisporus*. Significant differences occurred when the continent was taken into consideration. The percentage of FHT⁺ isolates associated to *Cupressus* spp. was 2 times higher in North America than in Europe (61 and 28%, respectively). None of the five isolates collected in open areas in North America showed the FHT⁺ ability, but they were too few numerous to allow us to conclude that FHT⁺ isolates cannot be found in this type of habitat (Table 5).

The two isolates of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* and the hybrid var. *eurotetrasporus* x var. *bisporus* were tetrasporic and unable to fruit at 25 °C. The 26 French isolates of *A. bisporus* var. *bisporus* analysed bore average basidial spore numbers (ASN) varying from 2.0 to 2.87. No correlation was found ($r = -0.17$, ns) between ASN values and the numbers of sporophores produced at 25°C. Moreover, the isolate producing the highest ASN (2.87) did not produce any fruiting bodies at 25°C.

Table 5: Habitat and FHT⁺ ability of the var. *bisporus* isolates.

Continent	Habitat	Isolate numbers		% FHT ⁺ isolates
		Total	FHT ⁺	
North America	Wooded area	22	16	72.7
	<i>Cupressus</i> spp.	13	8	61.5
	Open area	5	0	0
Europe	Wooded area	43	13	30.2
	<i>Cupressus</i> spp.	36	10	27.8
	Open area	20	12	60.0

Effect of the temperature on radial mycelial growth. — All the isolates of *A. bisporus* var. *bisporus* grew at 18, 24 and 30°C, but a wide range of radial mycelial growth was observed, irrespective of the temperature. The distribution of the mycelial growth at 18 and 30°C did not differ significantly ($p=0.05$), whilst data recorded after 21 days at 24°C moved significantly ($p<0.01$) toward higher values (Figure 5). Pearson correlation coefficients were found highly significant for radial growth at 24°C vs 18°C ($r=0.721$, $p<0.001$), 30°C vs 1 °C ($r=0.448$, $p=0.004$) and 30°C vs 24 °C ($r=0.601$, $p<0.001$). Thus the classification of the isolates for radial mycelial growth was considered similar at the three temperatures. The four isolates able to grow at 33°C showed a slow radial growth (Figure 5), and only one of them exhibited the FHT⁺ ability in the cultivation experiments. The group of FHT⁺ isolates and the group of FHT⁻ isolates (identified from the cultivation experiments) did not differ significantly ($p=0.05$) between themselves for radial mycelial growth at 18, 24 and 30°C (not shown). The North American and the European isolates did not differ significantly ($p= 0.05$) for this trait.

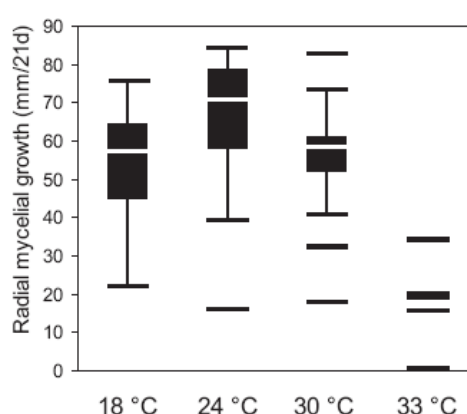


Figure 5: Distribution of the average mycelial growth of the var.*bisporus* isolates at four temperatures after 21 d of incubation.

Table 6: Distribution of the isolates according to the temperature leading to the highest radial growth rate, recorded at five times during the incubation period.

Incubation temperature	Isolates (% total numbers) after incubation for				
	4 d	7 d	11 d	14 d	21 d
18 °C	2.0	0	0	0	0
24 °C	24.5	57.1	69.4	71.4	81.6
30 °C	73.5	42.9	30.6	28.6	18.4

After 4-day incubation, 73% of the isolates exhibited a higher radial growth at 30°C compared with the two other temperatures. Then the percentage of isolates preferring 30°C

to grow fell steadily to 18% on day 21, showing that, for numerous isolates, this temperature gradually affected the metabolism involved in mycelial development. The few isolates showing higher radial growth after 21 days at 30°C than at the other temperatures originated from North America (Desert, MX) and Europe (FR, GR, RU). The percentage of isolates showing the higher radial growth at 24°C increased during the incubation to overcome 80% on day 21. The lowest temperature (18 °C) was not adapted to obtain substantial radial growth (Table 6).

Comparison of FHT⁺ and FHT⁻ isolates for yield at 17 °C — Yields obtained at 17°C for the North American isolates of var. *bisporus* showed that the FHT⁺ sample tended to contain more highly productive isolates than the FHT⁻ sample ($T=0.414$, not significant with the Cramer von Mises' test; significant at $p=0.05$ with the Smirnov's test). The var. *burnettii* sample did not differ from the American FHT⁺ sample of var. *bisporus* ($p=0.05$). Considering European isolates of var. *bisporus*, the FHT⁺ sample differed significantly from the FHT⁻ sample ($T=1.131$, $p<0.01$). Sixty two percents of the FHT⁺ isolates reached or overcame the average yield of 20 sporophores per kg of substrate, whilst only 36% of the FHT⁻ isolates reached such yields. The var. *bisporus* samples defined by a different continent but of same FHT trait did not differ significantly for the yield at 17°C. The two isolates of var. *eurotetrasporus* and the intervarietal hybrid yielded few mushrooms, and differed significantly from the var. *burnettii* and var. *bisporus* populations (Figure 6). Mushroom yield at 17 °C did not correlate with radial mycelial growth at any temperature tested.

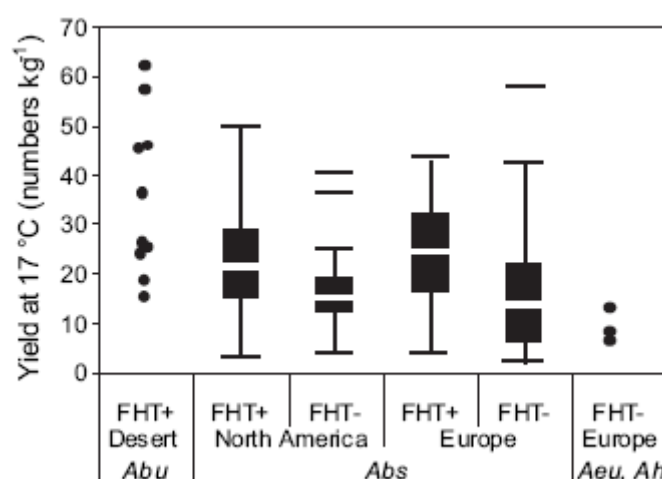


Figure 6: Distribution of the average yields at 17 °C. Yields are expressed as average mushroom number per kg of substrate after a 49-d fruiting period. Abu = *A. bisporus* var. *burnettii*; Abs [*A. bisporus* var. *bisporus*, Aeu = *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*, Ah = the intervarietal hybrid var. *eurotetrasporus* x var. *bisporus*.

Effect of the geographical origin of the FHT⁺ isolates on yield at 25°C — The distributions of the yields observed at 25 °C for the var. *burnettii* isolates (Desert California) and for the FHT⁺ isolates of var. *bisporus* collected either in North America or in Europe differed significantly ($T=1.083$ and $T=2.006$, respectively). Considering var. *bisporus* isolates, similar distributions of mushroom yields were observed for isolates collected in North America and in Europe ($T=0.346$), and for isolates originating from coastal and inland sites, irrespective of the continent ($T=0.053$) (Figure 7A). Analysis of the fructification at 25°C expressed as the percentage of yield at 17 °C gave the same results.

Yields of *A. bisporus* var. *burnettii* at 17°C and 25°C correlated positively and significantly ($r=0.708$, $p=0.022$). At 25°C, 90% of the isolates produced over 88% of the yield observed at 17 °C, and 60% yielded 100 to 185%. Conversely, no significant correlation ($p=0.05$) was observed for the FHT⁺ isolates of var. *bisporus*. Only 29.4% of the FHT⁺ American isolates (5 in 17) were more productive at 25°C compared with 17°C, and the percentage decreased to 13.8% (4 isolates in 29) for the FHT⁺ European isolates (Figure 7B). Sporophores maturation of var. *bisporus*, irrespective of the FHT⁺ isolate, occurred faster at 25°C than at 17°C. No relationship was detected between FHT⁺ ability and radial mycelial growth at any temperature tested.

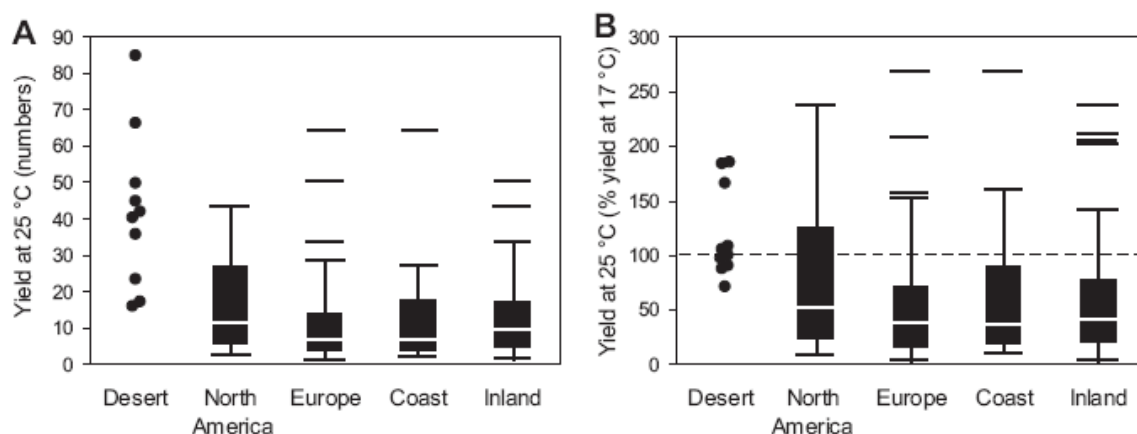


Figure 7: Distribution of the average yields at 25°C recorded for var. *burnettii* isolates (Desert) and var. *bisporus* isolates (North America, Europe, Coast, and Inland). Yields after a 49-d fruiting period are expressed as average mushroom number per kg of substrate (A) and as percentage of the yield obtained at 17°C (B).

Comparison of the FHT⁺ isolates for the first picking day — At 17°C, no significant difference ($p = 0.05$) was detected between the var. *burnettii* and the var. *bisporus* samples for the time course between casing and the first picking. The first picking day occurred earlier at 25 °C

than at 17°C for all but one of the var. *burnettii* isolates. Conversely, each of the four groups of var. *bisporus* (North America, Europe, Coast and Inland) showed 50% of isolates or more that were significantly less early fruiting at 25°C. The FHT⁺ samples of var. *bisporus* from North America and Europe did not differ significantly ($T=0.067$) between them for this trait. Similarly, the coastal sample did not differ significantly from the inland sample ($T=0.095$) (Figure 8). The four groups of var. *bisporus* differed significantly from the var. *burnettii* sample of Desert California for the difference between the first picking day (expressed as days after casing) at 25°C compared to 17°C ($T=0.959$, 1.108, 1.322 and 1.211, respectively).

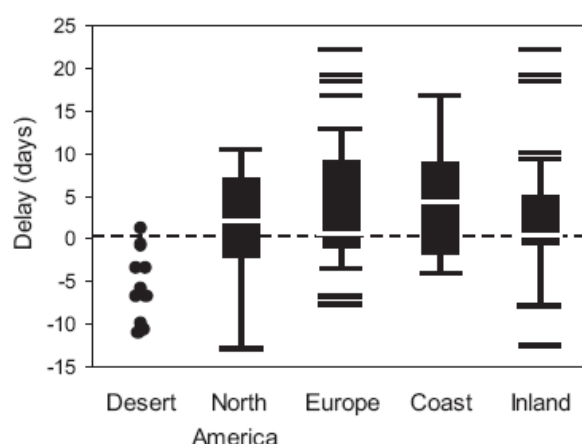


Figure 8: Delay between the first picking days at 25°C compared with 17°C for var. *burnettii* isolates (Desert) and var. *bisporus* isolates (North America, Europe, Coast, and Inland). Delay 0= same date for the first picking day at both temperatures, negative values = first picking occurring earlier at 25°C, positive values= first picking occurring later at 25°C compared with 17°C.

DISCUSSION

The most important result of this investigation is the relationship between the FHT⁺ trait and the infraspecific taxa of *Agaricus bisporus*. The study of both the French and Greek isolates of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* and the wild hybrid (var *bisporus* x var. *eurotetrasporus*) led to conclude that this variety requires a temperature lower than 25 °C to develop mature fruiting bodies. All the ten isolates of *A. bisporus* var. *burnettii* studied showed the FHT⁺ character, higher yield and shorter delay for first picking at 25 °C compared with FHT⁺ isolates of var. *bisporus*, meaning that the FHT⁺ trait is fixed in the isolated population of the Sonoran Desert in California. In a fruiting test not reported here, a strain of *A. bisporus* var. *burnettii* produced high mushroom yield at 30 °C (unpublished data). This ability to produce mature fruiting bodies at high temperature, associated to other particularities of the variety, such as the faster development of the sporophore and the preponderantly heterothallic life

cycle made this variety able to complete its life cycle during the short and rare humid periods. The rest of the time, the mycelium resists perfectly dryness, as other varieties do, considering *A. bisporus* var. *bisporus* can be collected in arid dunes in France, and dried invaded compost was used as spawn in the past. These observations suggest that the FHT⁺ trait in *A. bisporus* var. *burnettii* might be the result of an absence of fruiting regulation by the temperature, or that this variety tolerates a wide range of temperature for sporophore development.

The larger sample of *A. bisporus* var. *bisporus* comprised both FHT⁺ and FHT⁻ isolates. The ancestral condition of this variety for the FHT trait remains unknown; moreover, it is possible that the genetic determinism and properties of this trait differ in var. *bisporus* and var. *burnettii*. It is known that *Agaricus bisporus* occurs naturally from boreal regions to equatorial climate. The FHT trait variability observed in *A. bisporus* var. *bisporus* informs on the temperature range allowing sporophore development, but not on the optimal temperature for each strain to develop mature fruiting bodies. Results show three important characteristics of isolates or populations of *A. bisporus* var. *bisporus*: i) isolates exhibiting FHT⁺ or FHT⁻ phenotypes in cultivation coexist in all studied populations, ii) under standard conditions of cultivation at 17 °C, the FHT⁺ isolates produced better yields compared with the FHT⁻ isolates, and iii) the rate of FHT⁺ isolates in regional populations is higher in North America than in Europe.

The question of the adaptation of *A. bisporus* var. *bisporus* to the climate must be carefully considered because the standard conditions used for cultivation are, indeed, infrequently encountered in the more or less hot temperate regions where samples come from. In most of these regions, the hottest season is generally associated with dryness and, therefore, is not the most appropriate for mushroom fruiting. For instance, around Bordeaux (sites FR4 and FR6), samples have been collected in any month but in July (the hottest month, with 16-27 °C, 39 mm rainfall), with a peak in November, the most rainy month (10-14°C, 80 mm). Under the Mediterranean climate of Greece, fruiting bodies appear on manure from early autumn to late spring, whilst under Cypresses they are collected from winter to early spring, when the litter is sufficiently humidified by rainfalls (Theochari *et al.* 2003). Fruiting in summer, after occasional rains, seems without any advantage. That could deplete the energy stock of FHT⁺ strains, making them less efficient during the most favourable season. In other terms, the characteristics of the FHT⁺ mycelia that appear profitable in our cultivation experiments and potentially profitable for mushroom cultivation in general, could be negatively selected in certain situations under temperate climate. The coexistence of both FHT phenotypes can be explained by a subtle equilibrium between advantage and

disadvantage of each phenotype in the variable conditions of temperate climate. Moreover, the two thresholds of 17 and 25°C chosen for practical reasons are arbitrary. Maybe the variable 'maximum temperature for fruiting' has a continuous frequency distribution between the highest temperature until which any wild strain can fruit and the lowest temperature under which no strain can fruit. In such a distribution, the two FHT⁺ and FHT⁻ phenotypes represent two classes defined above and under the 25°C arbitrary threshold cut off point. Indeed, FHT is not a discrete trait and, therefore, its genetic determinism is unlikely monogenic.

Xu *et al.* (2002) reported that all fruiting bodies isolated from each of two sample locations, Dinard and Gradignan (sites 24 and 13 in the present work), were genetically unique. This diversity and the conclusion that the FHT⁺ ability is not a fixed trait in the variety *bisporus* agree with the absence of correlation between geographical parameters and the FHT⁺ ability, leading to the collect of both FHT⁺ and FHT⁻ isolates at a single site on a single day. Lewinsohn *et al.* (2000) reported that 12 European genotypes of *P. eryngii* showed higher growth rate at 27 °C than most of the Israeli genotypes, but the latter tolerated stress conditions (37°C) better. In our study, neither the mycelial growth at the various temperatures tested (18 – 33°C) nor the optimal temperature discriminated between the FHT⁺ and FHT⁻ samples.

In other respects, it remains difficult to find a climatic or environmental reason explaining the higher rate of FHT⁺ isolates found in North American populations. Possible gene flows might explain this difference. Gene flow from hypothetical FHT⁺ tropical populations or from the var. *burnettii* in America, as well as gene flow from FHT⁻ cultivated mushrooms in Europe would have produced a geographical gradient or variation between regional populations, that we did not observe. Alternatively, this difference could result from the different history of the two continental populations and/or from differences between the genetic determinism of their FHT traits.

It is clear that unlike the variety *burnettii* which is well adapted to be grown at 25 °C, most of the *A. bisporus* var. *bisporus* FHT⁺ isolates were less productive and less early fruiting at 25 °C compared with 17 °C. At 25°C, FHT⁺ isolates of the two varieties produced mushrooms that developed faster and lost firmness to the touch at harvest. Both traits are known to be negatively correlated with quality during shelf life (Burton *et al.* 1995; Simon and Gurria 2000). However, some *A. bisporus* var. *bisporus* isolates revealed a good potential for cultivation at 25 °C. Interestingly, no disease symptoms were observed during the experiments. In previous investigations (Savoie and Mata 2003) including several isolates of var. *bisporus* analysed in the present study, the FHT⁺ isolates have shown similar range of *in*

vitro sensibility to *Trichoderma* metabolites than the FHT⁻ isolates, leading to expect similar behaviour during spawn run. Some FHT⁺ isolates might be tolerant to *P. tolaasii* based on the link between the cap colour of the mushroom and its resistance to the bacterium (Moquet *et al.* 1999).

FHT⁺ strains of *A. bisporus* var. *bisporus* represent a good genetic basis to start breeding programs in view to produce FHT⁺ commercial strains for reducing energetic costs during cultivation in hot countries as well as in temperate countries during the hot season. They are currently used as starting material to study the genetic determinism of the FHT trait. Comparative genetics of the two varieties, for which the whole genome sequences are available (<http://genome.jgi-psf.org>), would be a way to study the mechanisms of fruiting body initiation by temperature.

Article 2 - Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce high yields of mushrooms at 25°C.

INTRODUCTION

The button mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach has been cultivated in France since the 18th century and expanded to other continents later. It is now the dominant cultivated mushroom in Europe and the Western hemisphere. Unfortunately it requires temperature below 20°C for producing fruiting bodies, which is currently limiting the development of its cultivation in some warm areas of the world. The pavement mushroom *Agaricus bitorquis* (Quelet) Saccardo has been proposed as an alternative because it prefers higher temperatures (25°C) than *A. bisporus* during harvesting (Nair *et al.* 1987; Gea *et al.* 2003). However the yields of commercial strains are lower than those obtained with *A. bisporus* under optimal conditions. In middle scale experimental cultures, yields from 9.3 (Sobieralski *et al.* 2010) to 22 kg m⁻² (Nair *et al.* 1987) had been reported whereas for cultivated strains of *A. bisporus* we observed average yields between 22 kg m⁻² to 30 kg m⁻² (Largeteau *et al.* 2008; Foulongne-Oriol *et al.* 2012). Comparing two efficient composts, Kariaga *et al.* (2012) observed yields of *A. bitorquis* being 51 or 74 % that of *A. bisporus*. Consequently it is a challenge to find strains of *A. bisporus* able to produce high yields of good quality mushrooms at 25°C for saving energy used in cooling systems during cultivation in warm countries.

Crop wild relatives and local varieties are the elements of agricultural biodiversity most likely to contain the necessary novel genetic diversity which is needed to sustain innovations in breeding programs. This assertion is also true for cultivated mushrooms. Since the end of the 80's, *A. bisporus* germplasm has been built with hundreds of wild isolates originating from various habitats and numerous geographic origins (Callac *et al.* 2002; Kariaga *et al.* 2012). In a previous study, we screened 114 wild strains from the major geographical populations of *A. bisporus* for their ability to produce mature fruiting bodies at the normal temperature used for cultivation (around 17°C) and at a higher temperature, set around 24°C (Largeteau *et al.* 2011). One quarter of the strains of *A. bisporus* var. *bisporus* were able to fruit at this higher temperature and were called FHT⁺. They belonged to all the studied populations. The

experiments had been performed in small crates containing 500 g of commercial compost, which are too small for an efficient evaluation of yield potentials at both temperatures. The objective of the present work was to better understand the adaptation of *A. bisporus* to temperature by analyzing the yield related traits of a selected sample of FHT⁺ strains cultivated both at 17, 25 and 30 °C.

MATERIALS AND METHODS

Eight wild strains of *A. bisporus* with the highest fructification level at 25 °C expressed as the percentage of the yield at 17 °C were selected from the data of Largeteau *et al.* (2011). Bs0094 and Bs0738 were *A. bisporus* var. *burnettii* originated from the population in Sonoran Desert of California and isolated by J. Burnett in 1991 (Callac *et al.* 1993). The others were *A. bisporus* var. *bisporus*. Bs0190, Bs0419B, Bs0483 and Bs0739, that had been isolated under *Cupressus macrocarpa* by P. Callac. Bs0190 originated from west of France (Lorient) in 1992; Bs0419B originated from southwest of France (Capbreton) in 1994. Bs0483 originated from Canada (Alberta) in 1996, and was supplied by R. Kerrigan. Bs0739 originated from Mexico (Tlaxcala) in 2007 (isolated by G. Mata). A strain, Bs0571, had been isolated on cow manure in Greece (Larissa) in 1998 and the last one, Bs0705, grew in a mule ring fence in Portugal (Alentejo) and had been isolated in 1998 by P. Callac. The cultivated hybrid HU1 entered in collection in 1990 with the reference number Bs0026 was unable to produce fruiting bodies at 25°C (Largeteau *et al.* 2011). It was used as FHT⁻ control. All the strains are stored under liquid nitrogen in CGAB (Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux), at INRA-Bordeaux, France.

Mushrooms were grown on commercial mushroom compost based on wheat straw and horse manure supplied by a local mushroom grower using an indoor composting technology (SARL Renaud, France). Compost was spawned at 0.8 % and placed in 0.09 m² trays filled with 8 kg of spawned compost. Spawn was obtained as axenic cultures on processed rye grain used by spawn makers (Euromycel, France). Twelve trays were spawned with each *A. bisporus* strain. Incubation was performed in a mushroom growing room equipped with controlled environment (temperature, air speed, and humidity) at 25°C (compost temperature) and 92% relative humidity in air for 13 days, after which a conventional casing layer (SARL Renaud, France) was added on top of the compost. Nine days after casing, the trays were distributed in three different mushroom growing rooms. In each 19 m³ room, CO₂ concentration was lowered by air flow (38 m³ h⁻¹). A room was set at 17°C and the air and relative humidity was maintained at 87 to 90 %. Another room was set at 25°C and the last one at 30°C, both with 92-95 % of relative humidity. Mushrooms were harvested for 5 weeks

at developmental stage 3, with a closed veil and the weights of and numbers of mushrooms were recorded daily for each tray. The yield (Kg m^{-2}) and the number of fruiting bodies (nb m^{-2}) per surface unit were used as parameters. The earliness was defined as the time, in days, from casing until the first harvest (Foulongne-Oriol *et al.* 2012). Pearson correlation coefficient and their Bonferroni probabilities were used to show the relationships between the parameters. Two ways variance analysis was used for the significance of the effect of the strains and temperature on each parameter. The analyses were performed with Systat 8.0.

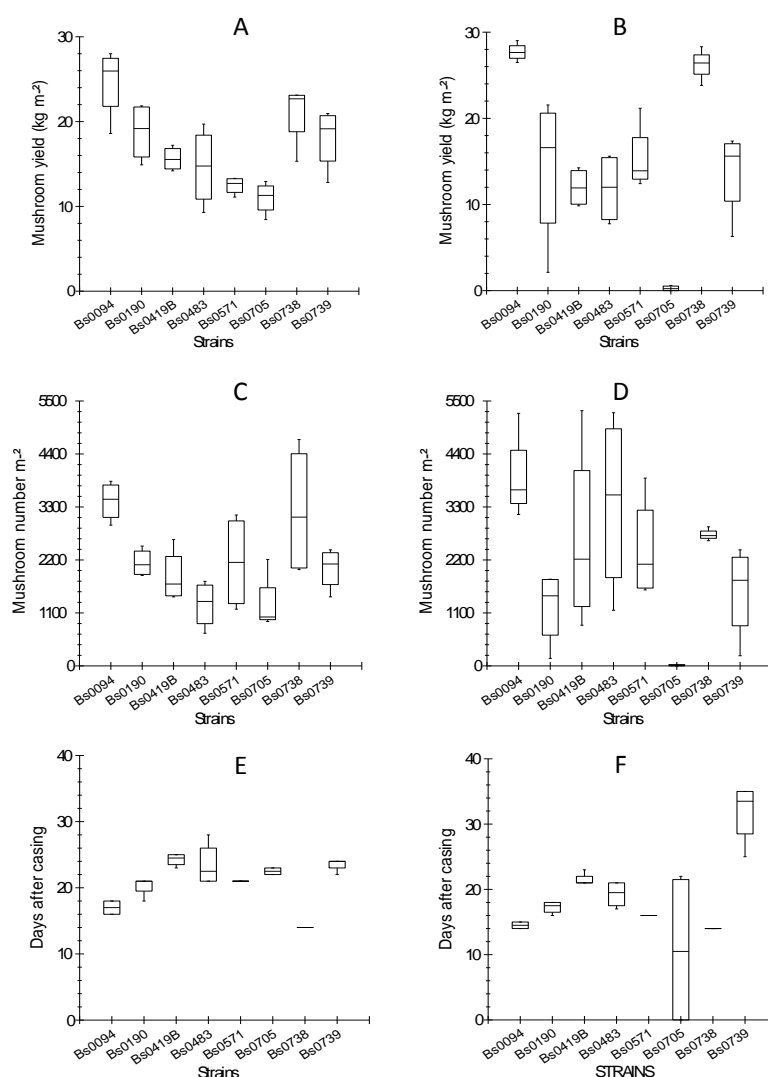


Figure 1: box-plot representation of data distribution for yield and earliness measured at 17°C or 25°C on 8 FHT⁺ strains of *A. bisporus*. A= Yield as Kg mushroom m^{-2} obtained at 17°C; B= Yield obtained at 25°C; C= Number of mushrooms per surface unites at 17°C; D= Number of mushrooms per surface unites at 25°C; E= earliness (delay for the first harvest of mushrooms, in days) at 17°C; F= earliness at 25°C.

RESULTS

The FHT⁻ control (strain Bs0026) did not produced mature fruiting bodies at 25 °C and the mean yield at 17°C was 23.2 Kg m⁻² which was in the mean values usually recorded in our experimental facilities for this strain. This data stress that the compost and cultivation conditions were suitable for the present experiment. For the FHT⁺ strains, the distribution of the data as shown with the box-plot representations (Chambers *et al.* 1983) was wider at 25°C than at 17°C for all the three parameters (Figure1). This might be the result of a higher heterogeneity of the temperature inside the climatic rooms when set at 25°C. The strains Bs0705 produced few mushrooms, and only on half of the trays at 25°C. Consequently it was removed for the following ANOVA. For both yield and mushroom number, the effects of the strains were significant at $p<0.01$ and there were no significant effects of temperature. Effects of the interaction strain x temperature effect was significant at $p<0.1$ for the yield and $p<0.05$ for the number. Both strain, temperature and their interaction affected significantly earliness ($p<0.05$). The absence of significant effect of temperature in ANOVA was the result of some opposite behavior among the strains. They were differently affected by the temperature.

Only the two strains of *A. bisporus* var. *burnettii* produced fruiting bodies at 30°C, with 2.8 and 34.9 Kg m⁻² for Bs0094 and Bs0738 respectively. Both the weight and number of mushrooms were not significantly different at 25°C and 30°C for Bs00738, whereas Bs0094 was affected by temperature increase from 25 to 30°C. Bonferonni tests at $p<0.05$ for comparing the individuals after ANOVA (Table 1) show Bs0094 and Bs0738 were also the strains with the highest yields at 25°C (Figure 1B), the highest mushroom numbers at 17°C (Figure 1C) and the best earliness at both temperatures (Figure 1E and 1F) . The differences between the strains of the variety *bisporus* were not significant for the yield at 25°C and mushroom numbers at 17°C. At 17°C (Figure 1A), Bs0190 and Bs0739 equaled the yield of Bs0738, but not of Bs0094. At 25°C the number of mushrooms (Figure 1D) produced by Bs0419B and Bs0571 were as high as that produced by Bs0738, and Bs0483 equaled the highest value of Bs0094. The comparison of means at 17°C and 25 °C for each strain showed no significant differences in yield for Bs0094, Bs0190 and Bs0571 (Table 1) whereas the yield of Bs0738 was significantly higher at 25°C than at 17°C and it was significantly lower for the other strains. The only significant difference in number of mushroom was a higher value at 25°C for Bs0483. Earliness was significantly different for all the strains but Bs0738. All the numbers of days after casing were higher at 17°C than 25 °C, except for Bs0739 with a lesser earliness at 25°C.

Table 1: Yield and earliness of FHT⁺ strains of *A. bisporus* cultivated at 17°C or 25 °C.

<i>A. bisporus</i> Strains	Yield (Kg m ⁻²)		Number of mushrooms (nb m ⁻²)		Earliness (days after casing)	
	17°C	25°C	17°C	25°C	17°C	25°C
Bs0094	24.6 a A	27.0 a A	3419 a A	3924 a A	17.0 a C	14.5 b E
Bs0190	18.8 a BC	14.2 a B	2142 a B	1217 a E	20.2 a B	17.2 b D
Bs0419B	15.6 a CD	12.0 b B	1863 a B	2644 a BC	24.2 a A	21.5 b B
Bs0483	14.6 a D	11.8 b B	1278 b B	3378 a AB	23.5 a A	19.2 b C
Bs0571	12.5 a D	15.3 a B	2152 a B	2425 a CD	21.0 a B	16.0 b D
Bs0738	21.0 b AB	27.1 a A	3219 a A	2725 a BC	14.0 a D	14.0 a E
Bs0739	18.0 a BC	13.7 b B	2019 a B	1544 a DE	23.5 b A	31.7 a A

Within a column, values followed by different capital letters differ significantly at $p < 0.05$.

Within a line, values followed by different lower case letters differ significantly at $p < 0.05$ between 17 and 25 °C, for each parameter.

Pearson correlation matrix (Table 2) shows the significant positive correlation of the yields (both as weight or number) and earliness at 17°C with the yields and earliness at 25°C. Earliness at 17°C was significantly correlated with all the other parameters. The more productive strains expressed this ability at both temperatures and were those producing rapidly their first mushrooms at 17°C. Earliness at 25°C was only significantly correlated with the weight of mushrooms harvested at 25°C. This was a consequence of the specific behavior of Bs0739. These correlations show the fitness of the strains, or their ability to complete their reproductive cycle rapidly, abundantly and under various conditions.

Table 2: Pearson correlation matrix of yield and earliness measured at 17°C or 25°C on seven FHT⁺ strains of *A. bisporus*.

	Yield 17°C	Yield 25 °C	Mushroom number 17°C	Mushroom number 25°C	Earliness 17°C	Earliness 25°C
Yield 17°C						
Yield 25 °C	0.697***					
Mushroom number 17°C	0.513*	0.605***				
Mushroom number 25°C	0.367	0.552**	0.190			
Earliness 17°C	-0.635***	-0.802***	-0.657***	-0.334		
Earliness 25°C	-0.254	-0.504*	-0.377	-0.360	0.660***	

Pearson correlation significant at *** $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.1$.

DISCUSSION

All the present data are in agreement with our previous observation of a relationship between the FHT⁺ trait and the infraspecific taxa. The FHT⁺ trait appeared to be fixed in the isolated population of *A. bisporus* var. *burnettii* from the Sonoran Desert in California (Largeteau *et al.* 2011). This variety tolerates a wide range of temperature (17-30°C) for fruiting body development with a low delay for fruiting, even if some diversity between the scores of the strains might be observed. However, the mushrooms are small, they open rapidly. The combination of these traits contributes to the adaptation of *A. bisporus* var. *burnettii* for completing rapidly its life cycle in an environment where the favorable period with enough humidity is short. This variety is probably an interesting source of genetic background for introducing the ability to fruit with high yields under various temperature conditions. However, as it is far from the standard of commercialization in Europe, it might introduce undesirable traits hampered its use for breeding (Foulongne-Oriol *et al.* 2012), even if its life cycle is an advantage for the selection of homokaryons (Callac *et al.* 1993).

We confirmed here the interest of some wild of strains of *A. bisporus* var. *bisporus* as a good genetic basis to start breeding programs in view to produce FHT⁺ commercial strains. For instance the strains Bs0190 and Bs0571 combined interesting scores for both yield and earliness at 25°C, and they came from different populations isolated on different substrates. One of the limits in the use of wild strains or hybrids adapted to fruit at 25°C is the fact that at this fruiting temperature, the mushrooms tend to develop faster, to rapidly lose firmness and to be susceptible to bruising leading to discoloration. These traits might affect the quality during shelf-life and should be counter-selected. Works are in progress in order to study the mechanism behind discoloration and to breed for bruise-related browning resistant strains (Gao *et al.* 2011; Weijn *et al.* 2012). The combine selection of FHT⁺ and bruising sensitivity could be promising. On another hand, the improvement of the strains able to fruit at 25°C will benefit of the genomic data that are now available for *A. bisporus* (Morin *et al.* 2012).

Conclusion

Au vu de l'étendue de la distribution géographique des souches sauvages d'*A. bisporus* qui ont été reportées dans la littérature, des régions boréales à des régions tropicales, il était légitime de se poser la question d'une adaptation à la température pour le développement, en lien avec les origines géographiques. Les deux souches d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* dont une a été isolée en Grèce et l'autre en Bretagne, ainsi que l'hybride naturel inter-variétal originaire de Bretagne n'ont pas produit de sporophores à 25°C.

L'échantillon de 101 souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* testées pour leur optimum de croissance mycélienne et leur aptitude à fructifier à 25°C ne contenait pas de spécimens issus de milieux extrêmes (il n'y en pas de disponible à l'état de souche vivante dans le germoplasme d'*A. bisporus*), mais il couvre une échelle de latitude et longitude assez large, allant du centre du Mexique à la Russie. Cependant, aucune corrélation entre les aptitudes à fructifier à 25°C (FHT⁺) et les origines géographiques n'a pu être mise en évidence, en dehors d'une plus forte proportion de souches FHT⁺ dans l'échantillon Nord-Américain (68 %) que dans l'échantillon européen (41 %). A titre d'exemple, 5 des 8 souches mexicaines testées sont FHT⁺, de même que 4 des 7 souches canadiennes. Nous n'avons pas non plus pu révéler de corrélation avec les températures moyennes mensuelles ou précipitations moyennes mensuelles sur chaque site de récolte, pour les mois où les souches ont été collectées. Enfin l'habitat (milieu ouvert ou fermé, litière de cyprès ou autre) n'a pas d'effet apparent. Comme près de 50 % des souches sauvages se sont révélées capables de produire de sporophores à 25°C, nous pourrions penser que ce seuil de température n'était pas assez discriminant. Cependant la majorité des souches FHT⁺, étaient fortement affectée avec des rendements significativement plus faibles et une précocité de fructification moindre à 25°C qu'à 17°C.

Bien que le dispositif à petite échelle ne permette pas de quantifier précisément le rendement, il montre quand même les potentialités intéressantes de quelques rares souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ; ces souches ont été testées à une échelle pilote (article 2). En résumé, les isolats d'*A. bisporus* var. *bisporus* de phénotype FHT⁺ et FHT⁻ en culture coexistaient dans toutes les populations étudiées. Aucun de cultivars testés en parallèle (résultat non montré) n'avait le phénotype FHT⁺. Cette diversité phénotypique intra-population peut être rapprochée de la forte diversité génétique révélée par Xu *et al.* (2002) au sein de deux sites de collecte où aucun individu ne présentait le même génotype. L'ensemble des observations évoquées ci-dessus indiquent que nous ne sommes pas en

présence d'une adaptation à des conditions climatiques spécifiques, mais plutôt à la possession, par certaines souches, d'un caractère d'élargissement de la gamme de température favorable à réalisation du cycle de reproduction. Ceci conférerait un avantage compétitif à ces souches pour la dissémination de leur génotype. Cet avantage semble lié à une vigueur reproductive particulière (fitness) puisque dans la condition standard de culture à 17 °C, le niveau de production de champignons des souches FHT⁺ était supérieur à celui des souches FHT⁻. Par contre cette aptitude à la reproduction n'apparaît pas associée à une aptitude à la survie puisque nous n'avons pas observé de lien entre le caractère FHT et la vitesse d'extension mycélienne à différentes températures.

Les données recueillies sur les 10 isolats d'*A. bisporus* var. *burnettii* montrent par contre une adaptation fixée dans cette population isolée. Toutes les souches sont FHT⁺, et avec en moyenne un rapport rendements à 25°C sur rendements à 17°C proche de 1 ainsi qu'une meilleure précocité de fructification à 25°C qu'à 17°C. Cette aptitude complète d'autres caractéristiques telles que le développement plus rapide des sporophores que pour *A. bisporus* var. *bisporus*, et le cycle de vie hétérothallique dominant. Ainsi cette variété peut achever son cycle de reproduction pendant les courtes et rares périodes humides rencontrées dans le Désert du Sonoran. Le reste du temps le mycélium peut survivre à la sécheresse. Cette possibilité est connue pour l'espèce puisqu'au début du 20^{ème} siècle, du compost envahi de champignon de Paris était conservé sec pour servir de réserve d'inoculum. *A. bisporus* var. *burnettii* présente donc un ensemble de caractéristiques d'adaptation à son environnement spécifique. Les mécanismes biologiques conduisant à cette adaptation pourraient différer de ceux permettant à certaines souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* de fructifier à 25°C.

Les expérimentations à l'échelle pilote ont permis de confirmer les potentiels de production de 2 souches d'*A. bisporus* var. *burnettii* et de 6 souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* sélectionnées à petite échelle pour leurs performances à 25°C, ainsi que les différences entre les deux variétés. Seules les souches d'*A. bisporus* var. *burnettii* ont été capables de fructifier à 30°C, même si le rendement était fortement diminué pour l'une d'entre elles. Elles ont produit leurs plus forts rendements à 25°C (27 Kg m⁻²) avec une meilleure précocité. Les rendements à 25 °C pour les *A. bisporus* var. *bisporus* étaient compris entre 12 to 16 Kg m⁻², avec un rapport 25°C / 17°C entre 0,8 et 1,2. L'adaptation de la variété *burnettii* aux températures élevées est confirmée. Certaines souches de la variété *bisporus* présentent également une tolérance intéressante à la température et pourraient être utilisées pour le développement de nouveaux cultivars.

Globalement, cette première approche a permis d'identifier des souches intéressantes pour la suite de l'étude et en particulier de distinguer l'effet variétal, ainsi que de définir le caractère FHT⁺ et d'émettre des hypothèses sur l'adaptation à la température.

CHAPITRE 3

Chapitre 3

Etude de l'implication d'un gène candidat dans l'adaptation d'*Agaricus bisporus* aux températures élevées

INTRODUCTION

Actuellement, les informations sur les gènes pouvant être impliqués dans la thermo-tolérance d'*A. bisporus* sont très limitées. Nous n'avons pu nous appuyer que sur les travaux d'une équipe chinoise. Wang *et al.* (2004) ont isolés des fragments de gènes associés à la thermo-tolérance du mycélium végétatif d'une souche particulière d'*A. bisporus*. Pour cela ils ont réalisé des DD-RT-PCR pour analyser l'expression différentielle de gènes dans du mycélium maintenu à 25 °C et du mycélium subissant une augmentation brusque de la température à 32°C pendant 12 h. Ils ont ainsi identifié trois gènes de thermo-tolérance : *028-1*, *023-11A* and *023-11B* (Chen *et al.* 2003, 2005, 2009). La séquence complète de l'ADN complémentaire (de l'ARN messager) de *028-1* a été publiée dans GenBank sous le numéro DQ235473 (Chen *et al.* 2005, 2008). Après avoir construit un vecteur d'expression binaire, le gène d'*A. bisporus* a été transféré dans une souche non thermo-tolérante, par transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Huit des 10 transformants obtenus ont poussé à 34 °C, comme la souche thermotolérante, alors que la souche sauvage n'a pas poussé (Chen *et al.* 2009). Cependant, que ce soit dans les transformants ou la souche donneuse, les vitesses de croissances à 34°C n'étaient que de 15 à 25 % celles mesurées à 28°C.

Afin de progresser dans la connaissance du gène *028-1* et de vérifier son implication potentielle dans la thermo-tolérance mycélienne et l'aptitude à fructifier à haute température, une étude des niveaux d'expression du gène et de son polymorphisme de séquence a été entreprise.

Dans l'article qui suit (Article 3), nous avons vérifié l'implication de *028-1* dans la thermo-tolérance du mycélium sur quelques souches sélectionnées dans le chapitre 2, puis le polymorphisme de séquence nucléotidique a été défini sur un échantillon représentant un quart des souches étudiées précédemment. Ces travaux ont permis une meilleure annotation du gène et une étude phylogénétique des relations évolutives entre les souches étudiées. Par ailleurs, nous avons recherché les relations potentielles entre le polymorphisme mis en évidence et la capacité de souches à fructifier ou non à haute température. Sur un sous-échantillon de souches capables de fructifier à 25°C, nous avons enfin cherché à déterminer si l'implication du gène que nous avons renommé *aap1* pouvait être révélée par une régulation différentielle d'expression au moment de la fructification à 17°C et à 25°C.

L'expression différentielle d'un second gène candidat (*hspA*, protéine de choc thermique) a été étudiée en parallèle et fait l'objet de l'article 4 sous forme d'une note 'Différentiel expression of *hspA* in FHT⁺ strains of *Agaricus bisporus* fruiting at 17°C and 25°C'.

Article 3 - Characterization of the *aap1* gene of *Agaricus bisporus*, a homolog of the yeast *YAP1*

INTRODUCTION

Agaricus bisporus (Lange) Imbach, the button mushroom, is a leaf-litter rot fungus. Of the major cultivated mushrooms, it has until recently been the least well known from nature. Since 1990, numerous isolates have been collected throughout the world at different sites on different kinds of decomposing lignocellulosic materials, and three varieties having different life cycles have been identified [Callac *et al.* 1993; Callac *et al.* 2003]. For many years, the

button mushroom has been grown in caves at 15-16 °C. Since the 1980's, climatic chambers replace caves, and cultivation conditions are standardized, with a 16-18°C temperature recommended during the cropping period, based on the requirement of the cultivated strains. Thermo-tolerance is an interesting trait to be studied, both for the cultivation of the mushroom out of temperate countries, and for the understanding of the distribution of wild populations under various climates. Usually, a temperature over 32°C stops the growth of the vegetative mycelium. In a recent work, 91 isolates from various geographic areas were screened for their ability to fruit at higher temperatures (FHT⁺ strains fruiting at 25°C) than the commercial cultivars. The mushroom variety discriminated for this trait, *Agaricus bisporus* var. *eurotetrasporus* was unable to develop any sporophore whilst *A. bisporus* var. *burnettii* was well adapted to fruit both at 17 and 25 °C, suggesting this phenotypic plasticity is a fixed trait in this variety. In the more common *A. bisporus* var. *bisporus*, the ability to fruit at 25°C was observed in some strains, but it correlated neither with climate/microclimate nor with habitat of the strains, and yields were always lower than at 17°C [Largeteau *et al.* 2011]. However we don't know the temperature at which the ancestor of the species fruited, neither the order in which the three varieties were separated.

To date, information on thermo-tolerance mechanisms of *A. bisporus* is scarce. Another cultivated mushroom, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer is generally regarded as a fungus that requires a low temperature (<15°C) for the induction or production of fruiting bodies, as compared with vegetative growth, which has an optimum temperature of 22 to 26°C [Sakamoto 2010; Tonomura 1978]. Fultz [1988] analyzed progenies of five crosses between strains with high and low fruiting temperature indicating that a minimum of two genes appeared to control the requirement for fruiting at > 15°C. Mutants able to fruit at 20°C and, for most of them, to grow at 33°C were recently obtained by ultraviolet irradiation mutagenesis and combined mutagenesis [Lin-Zhi *et al.* 2013]. In filamentous Ascomycota fungi, over-expression of a heat shock proteins (HSP70) enhances thermo-tolerance of *Trichoderma harzianum* [Montero-Barrientos *et al.* 2008]. Heat shock factor proteins (HSFs) are transcriptional regulators of genes that encode different types of stress proteins as HSPs. In *Coniothyrium minitans*, HSF1 over-expression enhances tolerance to heat stress [Hamid *et al.* 2013].

For *A. bisporus*, Chen, [Chen *et al.* 2003] obtained few thermo tolerance-related gene fragments with DD-RT-PCR to analyze gene expression in the vegetative mycelium of one *A. bisporus* strain (02) under normal and higher-temperature cultivation. They identified 3 genes of thermo-tolerance: *028-1*, *023-11A* and *023-11B* [Chen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2009]. The full-length cDNA sequence of one gene (*028-1* GenBank accession number DQ235473) had

been obtained [Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2008]. It has a size of 1.37 kb, and no obvious homological sequence was found in GenBank. The Chinese group constructed a binary expression vector of *028-1* of *A. bisporus* and transferred the gene into the non-thermo-tolerant strain 8213 of *A. bisporus* by *Agrobacterium*-mediated transformation. Eight out of ten of transgenic strains were able to grow at 34°C as well as the thermo-tolerant strain from which *028-1* had been identified, whereas the wild strain did not [Chen *et al.* 2009]. However both in the thermo-tolerant parent and the transformants, the mycelial growth rate was strongly affected, with mycelial diameters after 22 days at 34°C being 15 to 25 % that at 28°C. Despite the potential interest of this gene and its regulation, no other article than those published by Chen *et al.* was available. Therefore we proposed that an improvement of its annotation, a study of its polymorphism and level of expression in different strains should allow characterizing *028-1* and determine accurately the role of this gene in thermo-tolerance of *A. bisporus*.

The aim of the present work was then to progress in the knowledge of *028-1* gene and its involvement in the thermo-tolerance of some *A. bisporus* strains. The level of expression of *028-1* in the vegetative mycelium during a heat treatment was analyzed by q-PCR on several strains. We identified and annotated *028-1* in the genome of the homokaryon of the hybrid HU1 (H97) that had been used for the whole genome sequencing of *A. bisporus* var. *bisporus*. (http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbisH97_2/Agabi_varbisH97_2.home.html), but this hybrid is not thermo-tolerant. We established that *028-1* is a homolog of the *YAP1* gene involved in oxidative stress response in yeast.

YAP1p is an AP-1-like transcription factor. AP-1 is an activator protein that links to the promoter of the human metallothionein gene and the simian virus 40 (SV40) [Lee *et al.* 1987]. YAP1p is one of the 15 basic-leucine Zipper (b-ZIP) transcription factors implicated in various forms of stress response in yeasts. These are clustered in 7 families, 4 conserved in metazoans (ATF2, ATF6, CREB1 and Jun) and 3 only found in yeast (YAP, MET4 and MET28). The YAP (yeast activator protein) family includes eight members (YAP1-YAP8) [Rodrigues-Pousada *et al.* 2004; Rodrigues-Pousada *et al.* 2010]. Three of these members (YAP1, YAP2 and YAP8) contain YAP1 redox domain (IPR023167). *A. bisporus* *028-1* protein also contains this domain but differs from YAP1P in his sensing capability. That is why we propose to name *aap1* the gene *028-1*.

Data on *028-1* polymorphism and level of expressions in primordia and sporophores obtained at two temperatures in different strains are presented and discussed on the light of its putative role in thermo-tolerance of *A. bisporus*.

MATERIALS AND METHODS

Strains of *Agaricus bisporus*

The strains used in the different parts of the work are presented in Table 1. They all are maintained in Collection Germplasm of *Agaricus* at Bordeaux (CGAB) INRA, France.

Table 1. Strains of *A. bisporus*: origin, thermo-tolerance phenotypes, *aap1* genotypes and deduced protein phenotypes.

Strains of <i>A. bisporus</i>		Isolation area	Fructification at high temperature (25°C)	Survival of mycelium at 33°C	Genotypes, nucleic acids	Amino-acids
Bs0004	var. <i>bisporus</i>	Canada- British Columbia	0 ¹	0	4/5	2/2
Bs0085A	"	France- St Germain-des-Essourts	0	0	3/4	1/2
Bs0190	"	France- West- Lorient	1	0	1/4	1/2
Bs0285	"	France- West- La Rochelle	1	0	2/4	2/2
Bs0370	"	France- West- St Malo	0	0	1/4	1/2
Bs0374	"	England	1	0	1/1	1/1
Bs0416D	"	France- Guesnes	0	0	1/4	1/2
Bs0419B	"	France- South West- Capbreton	1	0	1/5	1/2
Bs0420	"	France- South West - Vieux-Boucau-les-Bains	0	0	1/3	1/1
Bs0431C	"	France- West- La Rochelle	1	0	1/11	1/2
Bs0470	"	Russia- Penza	1	0	nd	nd
Bs0474	"	Russia- Penza	1	0	1/4	1/2
Bs0483	"	Canada- Alberta	1	0	6/7	1/3
Bs0533	"	Cultivar - white hybrid, Amycel 2100	0	nd	nd	nd
Bs0564	"	Greece- Rovies	0	1	4/11	2/2
Bs0571	"	Greece- Larissa	1	nd	15/16	1/2
Bs0572	"	Greece- Crete Island- Zourva	0	0	2/4	2/2
Bs0584	"	Italy -Sicily	1	0	5/12	2/2
Bs594	"	Greece-Limni	nd	nd	17/nd	2/nd
Bs0661	"	Greece- Gravia	1	0	1/4	1/2
Bs0679	"	Spain- Sangüesa-Aragon	0	1	1/1	1/1
Bs0705	"	Portugal-Alentejo	1	0	13/14	2/2
Bs0717	"	USA- New Mexico	0	0	6/7	1/3
Bs0739	"	Mexico- Tlaxcala	1	1	1/6	1/1
Bs0094	var. <i>burnettii</i>	USA- California- Sonoran Desert	1	0	8/8	1/1
Bs0738 =Jb137	"	USA- California- Sonoran Desert	1	0	9/10	1/4
Bs0423	var. <i>eurotetrasporus</i>	France- West- La Rochelle	0	0	4	2/2
Bs0514	"	Greece- Larissa	0	0	4	2/2
Bs0261	Hybrid var. <i>bisporus</i> and <i>eurotetrasporus</i>	France- St Malo Dinard	0	0	1/4	1/2
Bs0026	var. <i>bisporus</i>	Cultivar - white hybrid, Sylvan HU1	0	0	1/4	1/2
Bs0026-7	homocaryon var. <i>bisporus</i>	Cultivar - white hybrid, Sylvan HU1			4	2
H97	homocaryon var. <i>bisporus</i>	Cultivar - white hybrid, Sylvan HU1			1	1
Jb137-s8	homocaryon var. <i>burnettii</i>	USA- California- Sonoran Desert			9	4

0 = did not produced fruiting bodies at 25 °C in Largeteau *et al.* (2011). nd= not done. ? = not determined.

Thermo-tolerance of the vegetative mycelium

In a first experiment we selected eight wild strains from our previous work [Largeteau *et al.* 2011], based on their ability (FHT⁺) or inability (FHT⁻) to produce mature sporophores at 25°C and to survive an exposure to 33°C. They were five *A. bisporus* var. *bisporus* (Bs0483, Bs0533, Bs0679, Bs0571, and Bs0739), two *A. bisporus* var. *burnettii* (Bs0094, Bs0738) and

a natural hybrid between var. *bisporus* and var. *eurotetrasporus* (Bs0261). They had been collected under sub-tropical, temperate or cold climates in America and Europe. Each strain was cultivated on liquid Cristomalt medium (Barley malt powder, Dif.A1) for 14 days at 25 °C in darkness and then divided into two samples. For each strain three samples were continuously cultivated at 25°C, and three others were transferred at 32°C for 12 h to induce expression of the thermo-tolerance related genes. Mycelium was harvested immediately, washed with iced water and immediately placed in liquid nitrogen to stop the synthesis of mRNA before being stored at -80°C until RNA extraction and purification.

In a second experiment, 25 wild strains of *A. bisporus* and a homokaryon (Bs0026-7 = HU 1-7), obtained in our lab by P. Callac [Callac 1994] from the cultivar hybrid HU1, were studied. Two of them were *A. bisporus* var. *burnettii*, two were *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* (Bs0423, Bs0514), 20 were *A. bisporus* var. *bisporus* and one was the natural intervarietal hybrid (Bs0261). Their survival and growth ability were tested here at 18°C, 25°C, 30°C and 33°C. Inoculum plugs (5 mm diameter) were removed from the edge of 15-days-old cultures and placed in the center of Petri dishes filled with Cristomalt agar medium. Three replicates were observed by strain and scored for survival and mycelial growth rates.

Production of primordia and fruiting bodies at 25°C

Nine wild strains from CGAB (INRA, France) previously identified for their ability to produce mature fruiting bodies at 25°C [Largeteau *et al.* 2011] were cultivated at an experimental scale. Spawn was prepared with cooked rye grains purchased by Euromycel (France) and cultivation was in 0.09 m² crates filled with 8 Kg of compost purchased from a local mushroom grower (Pons, France) and spawned at 0.8 %. Five replications were used. Incubation lasted 13 days at 25°C. After casing and post incubation during 7 days, half of the crates were moved to a fruiting room regulated at 17 ± 2°C and 87-90 % relative humidity in air; the other half to a fruiting room regulated at 25 ± 2°C and 92-95 % relative humidity. Primordia and fruiting bodies produced at 17°C or 25 °C were harvested in one crate for each strain and put immediately on ice. The pilei-pellis of fruiting bodies and gills were removed from the fruiting bodies which were placed in liquid nitrogen to stop the synthesis of mRNA and stored at -80°C until being required for RNA extraction and purification. The sampling units for RNA extractions were pools of extracts obtained from 25 primordia, or from five sporophores. The level of production of sporophores, for each strain, was estimated at each temperature on four crates.

Expression analysis of 028-1

Total RNA was extracted from samples of mycelia, primordia and sporophores stored at -80 °C. The frozen biomass was crushed with liquid nitrogen. Lyse of cells was obtained with the QIA shredder™ kit from Qiagen. The extraction and the purification of RNA were performed with the RNeasy ® Minikit (Qiagen) according to manufacturer's instructions with slight modifications: two stages of digestion of the genomic DNA were added, using the RNase-Free DNase Set (QIAGEN). The first one was during the extraction and the second during the purification. The final concentration and purity of extracted RNA were quantified using the absorption ratio of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} measured with NanoDrop® ND-1000, Labtech. Aliquots of total RNA were stored at -20°C.

RT-PCR was carried out using OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) with 800 ng of total RNA and 0.5 µM of oligo (dT) (Promega) for a final volume of 14 µL for each tube, in a PCR Thermocycler (Master cycler, Eppendorf). The samples were then incubated during 10 minutes at 65°C and put in ice.

The following reaction mixture was added for each tube: 2.5 µL DTT, 5 µL 5X first strand buffer, 1 µL M-MLV-RT (Kit M-MLV reverse transcriptase, Invitrogen), 2 µL dNTP, 0.5 µL RNasin ribonucleic inhibitor (Promega), for a 25 µL final volume. The tubes were incubated for one hour at 37°C and 15 minutes at 70°C. cDNA concentration was measured by spectrophotometry at 260 nm by using Nanodrop ® ND-1000 (Labtech). For every strain and every condition, aliquots of 20 ng/µL cDNA were stored at -20°C.

EF1-α (GenBank X97204) was used as housekeeping gene, with the primer pair EF3F (5'-TGGTCGTGGTGAGACTGGTA-3') and EF2R (5'-GGGTCGTTCTTGGAATCAGA-3'). For *028-1* (GenBank FJ940724.1 thermo-tolerance gene) the primer pair was Th5F (5'-AAGTGGGATGCTACCAAGG-3') and Th5R (5'-GGATATGGAACTCCACAGCG-3'). Real time PCR was performed using a LightCycler® 1.5 PCR (Roche Diagnostic) and the LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) kit, according to the manufacturer's recommendations. Every capillary contained 20 µL of reaction mixture which included 1 µL of primer sense (500 nM), 1 µL of primer antisense (500 nM), 4 µL of Master's Mix, 9 µL of water PCR-grade deionized and 5 µL of cDNA (2 ng/µL). All PCR reactions were carried out in triplicate under the following conditions: a step of enzyme activation at 95°C during 10 minutes, followed by 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C during 15

seconds; annealing at 59°C during 15 seconds; extension at 72°C during 20 seconds), and finally, a cooling step at 40°C for 30 seconds to ensure that the thermal chamber has cooled down upon opening the lid. The experiment was performed three times. A melting curve was run at the end of the 40 cycles to verify for a unique PCR reaction product. Standard curves were built with 7 serial dilutions of cDNA pools and each set of primers to check for identical amplification efficiency with material of the strain Bs0470.

In order to determine the gene expression level, we performed a relative quantification analysis using the comparative SYBR Green / ΔC_t method. Results were normalized using ΔC_t values obtained from housekeeping control gene *ef1- α* amplification products included in the same runs. All targets were analyzed in triplicate and mean levels of gene expression were calculated. An estimation of relative's levels of transcription of *028-1* gene was performed by Pair Wise Fixed Reallocation Randomization test on C_T values using the REST-384® software. Six measures per sample and condition were used for statistical analysis. The ratios (R) are calculated between the target gene (*028-1*) expression and the reference gene (*ef1- α*) according to the formula:

$$R = \frac{(E_{028-1})^{\Delta C_t 028-1 (\text{control} - \text{sample})}}{(E_{ef1-\alpha})^{\Delta C_t ef1-\alpha (\text{control} - \text{sample})}}$$

where

R is the relative expression ratio of a gene in a sample/ a control

E_{xx} is PCR amplification efficiency of the gene

$C_{t,xx}$ is the threshold cycle of the PCR amplification of the gene xx

Identification of homologs, sequences alignment and annotation of 028-1 gene

BLASTn was used for identifying *028-1* gene in the genome of *A. bisporus* var. *bisporus* (H97) and *A. bisporus* var. *burnettii* (JB137-S8) available at http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbisH97_2/Agabi_varbisH97_2.home.html and

http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbur_1/Agabi_varbur_1.home.html. *028-1* homologs were found using BlastP on Uniprot (<http://www.uniprot.org/blast/>) and PSI-Blast on GenBank.

Alignment between sequences of Ascomycota and Basidiomycota homologs of *028-1* was performed using Cobalt alignment tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) [Papadopoulos and Agarwala 2007]. Alignment between Basidiomycota homologs and

between YAP1 redox domains was done with MUSCLE (<http://www.phylogeny.fr/>). Alignment between chain A from PAP1, NLS and bZIP was done using BlastP on nr database on these parts of the sequences and BlastP two sequences on smaller fragments. When necessary and available, intron position on the gene was reported on protein sequence to improve alignment.

Domains were determined with CD-search on Conserved Domain Database, CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) and with InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Putative Nuclear Export Signal (NES) motif position was determined by sequence and position similarity and by determining the presence of hydrophobic amino acids characteristic places [Yan *et al.* 1998]. Putative Nuclear Localization Signal (NLS) was localized using NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) and the homology of this part of the *028-1* sequence with the yeast NLS was determined.

028-1 Polymorphism analysis

In addition to the 25 wild strains of *A. bisporus* used in the experiment of mycelium thermo-tolerance, a homokaryon Bs0026-7 [Callac 1994] from the cultivar hybrid HU1 was used for sequencing. This homokaryon contained the complementary sexual pole of the homokaryon of the hybrid HU1 that had been used at JGI (H97) (DOE Joint Genome Institute) for the whole genome sequencing of *A. bisporus* var. *bisporus*. (http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbisH97_2/Agabi_varbisH97_2.home.html). *028-1* sequence identified in the genome of H97 *A. bisporus* var. *bisporus* was used for polymorphism studies, as well as the sequence from the genome of *A. bisporus* var. *burnettii*, homokaryon JB137-S8 (http://genome.jgi-psf.org/Agabi_varbur_1/Agabi_varbur_1.home.html).

For DNA extraction, stock cultures were made on Petri dishes containing 25 ml of solid CristoMalt agar medium (Barley malt powder, Dif.A1) incubated for 21 days at 25°C in darkness. The mycelium was harvested, deposited in 2 ml tubes and frozen at -80°C. Mycelium was lyophilized and stored at 4°C until DNA extraction and purification.

Genomic DNA was extracted and purified from mycelium using DNA extraction Kit Phytopure (GE Healthcare) following the manufacturer's protocol. PCR primers were designed on *028-1* mRNA sequence (GenBank a.n.: DQ235473) using the Primer 3.0 software v.0.4.0 [Rozen and Skaletsky 2000]: ThF (5'-CCCTTCAATAAGCCCTGTCA-3'), ThR (5'-CCTGGATTGCGCTATAATCG-3'). The PCR mixture (50 µL) contained template DNA (30-

46 ng μl^{-1}), 2 μl ; primer (10 μM), 2 μL of each; dNTP mix (1.2 mM) (Eurobio, France), 5 μL ; 5X colorless GoTaq buffer (Promega, Madison, WI), 10 μL ; GoTaq DNA Polymerase 2 U (Promega M830B), 0.2 μl ; Bovine Serum Albumin (10mg/ml) (Promega R396D) 0,5 μL . PCRs were run on Eppendorf Mastercycler (USA) with an initial cycle of denaturation at 95 °C for 5 min followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1.5 min, and synthesis at 72°C for 1.5 min with a final extension at 72°C for 5 min. Amplified DNA (750-850 bp) was separated on a 1% agarose gel in 0.5 x Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer to identify the failed reactions. Sequencing of amplified products was performed by Cogenics (Beckman Coulter genomics, United Kingdom). Resulting sequences were aligned using CLUSTAL W software [Thompson *et al.* 1994]. Some sequences were then subjected to PSI-BLAST [Altschul *et al.* 1997] for homology search.

Agaricus bisporus var. *bisporus* has predominantly a pseudo-homothallic life cycle giving rise to heterokaryotic mycelium with potentially two different alleles for *028-1* gene. The sequences of three homokaryons and of two strains suspected to be haploid (*A. bisporus* var. *eurotetrasporus*) obtained by sequencing or from the *A. bisporus* genome were used as reference sequences. Moreover, some strains were homozygotes for the analyzed sequences. In four heterokaryotic mycelia, the presence of at least one deletion in one of the two alleles of the gene and reading in both directions was used to recover the sequence of each homokaryon by progressive manual realignments using BIOEDIT 7 [Hall 1999]. All these data were used to deduce the two putative haplotypes corresponding to the heteromorphic sequences in the other strains.

Each sequence was tagged with the reference code of the strain and (1) or (2) for the sequence of each of the two nuclei of the heterokaryons. A list of polymorphic sites including indels and nucleotide polymorphisms was generated. The 27 heterokaryons, 2 homocaryotic strains and 3 homokaryons represented 59 haplotypes. The sequences were aligned with ClustalW and analyzed to identify the positions of nucleotide polymorphism.

The phylogenic tree was constructed using neighbor-joining (NJBIO) method [Gascuel 1997] implemented in the Seaview program v4 [Gouy *et al.* 2010]. First sequences were aligned with MUSCLE (v3.7) [Edgar 2004]. Gap sites were include in the NJBIO analyze. Reliability for internal branch was assessed using the bootstrapping method (1000 bootstrap replicates).

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of 028-1 in the vegetative mycelium during heat treatment

Differences in expression levels of *028-1* due to incubation at 32°C for 12 h were studied in vegetative mycelium of 8 strains cultivated at 25°C. The treatment at this higher temperature induced a significant but relatively low over-expression of *028-1* (Figure 1) for 4 out 5 strains which had been shown to produce fruiting bodies at 25°C [Largeteau *et al.* 2011]. For Bs0679 which mycelium maintained a low growth rate at 33°C (Table 1) and two other strains, there was no significant regulation. Bs0261 was slightly affected, but with a down-regulation.

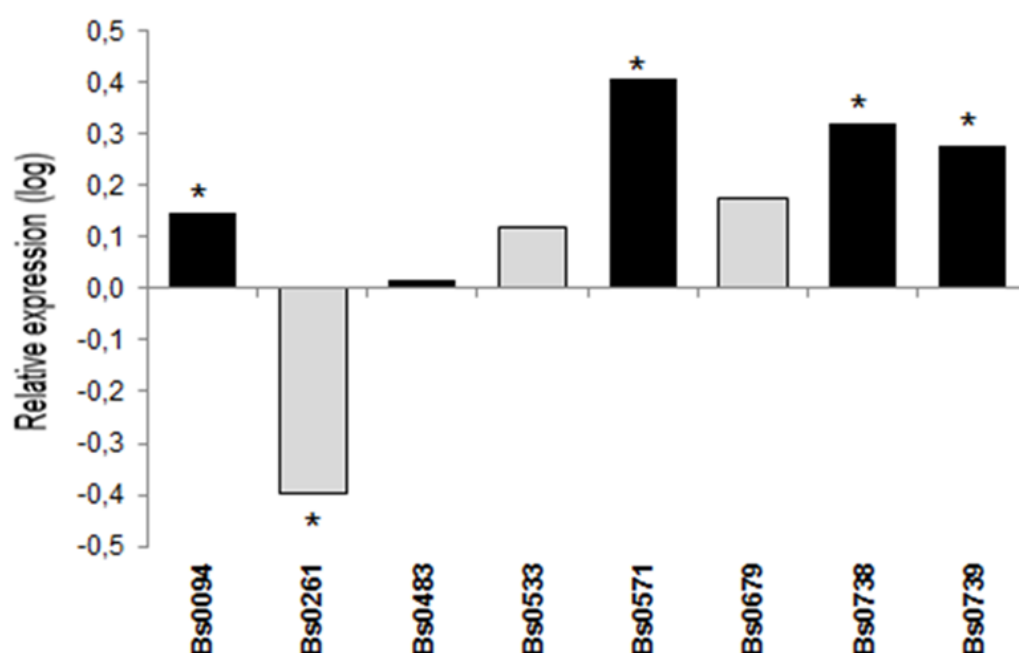


Figure 1. Effect of a treatment for 12 h at 32°C on vegetative mycelium grown at 25°C. Relative expression of *028-1* gene (32°C for 12 h vs. continuous growth at 25°C). Values are log-transformed data of expression ratios after normalization against the housekeeping gene *EF1-α*. Significantly different at * $p < 0.001$. Black bars are FHT⁺ strains, grey bars are FHT⁻ strains as defined in Largeteau *et al.* (2011).

The basal level of expression in mycelium of thermo-tolerant strains maintained at 25 °C was not different or 2 to 3 time lower than in susceptible strains. Chen *et al.* 2009, constructed a binary expression vector of thermo-tolerance-related gene *028-1* of a specific thermo-tolerant strain of *A. bisporus* and transferred it into a non-thermo tolerant strain by *Agrobacterium*-mediated transformation. Most of the 10 transgenic strains cultivated in compost to estimate their colonizing ability at different temperatures showed an obviously increased thermo-tolerance. Our own work with different strains and measurements of transcription levels showed that the up-regulation of *028-1* should be one of the factors associated with the reaction of the vegetative mycelium of some *A. bisporus* strains to increases in temperature. The basal level of expression in mycelium of thermotolerant strains maintained at 25 °C was not different or 2 to 3 time lower than in susceptible strains. The up-regulation of *028-1* in the thermo-tolerance of the vegetative mycelium being confirmed only for some strains, it was worth to characterize this gene and to define its DNA sequence polymorphism in a larger sample of strains.

3-2- Characterization of 028-1 gene and its corresponding protein

The gDNA sequences of the *028-1* gene from 24 wild strains and 3 homokaryons of *A. bisporus* were obtained and they allowed completing the information on this thermo-tolerance gene. By alignment of the cDNA sequence from [Chen *et al.* 2008] and gDNA obtained here, two exons and one intron of 54 bp were identified. A putative reading frame was defined by identifying ORFs and verifying that the polymorphic bases were mostly in the third place of the codons in exons. Positions of stop codon and of the beginning of 3'UTR were deduced. A new sequence of *028-1* gene was deposited in GenBank under the accession number (a.n.) FJ940724.1. The intron was localized at position 370-423 and a.n. of the corresponding protein sequence is ACR25139.1. The deposited sequence belongs to a wild strain from England being homozygote for this gene fragment. It corresponded to the most frequent allele found in our sample (see below).

This sequence annotation was coherent with models generated by the JGI softwares on the genome of *A. bisporus* H97. We improved the automatically generated model by using the homology with, *Laccaria bicolor*, *Coprinopsis cinerea* and *Phanerochaete chrysosporium* homologous sequences and found the beginning of the gene (Figure 2). This was confirmed by the similarity found on the genome of *A. bisporus* var. *burnettii* JB137-s8 (Protein ID 144436). The model generated has the protein ID 239429 on H97 genome v2 and was released in GenBank (EKV52013) with the publication of *A. bisporus* H97 genome sequence

[Morin *et al.* 2012]. The transcript and CDS sequences are 2.18 and 1.82 kb respectively, larger than the full-length cDNA sequence published by Chen (DQ235473).

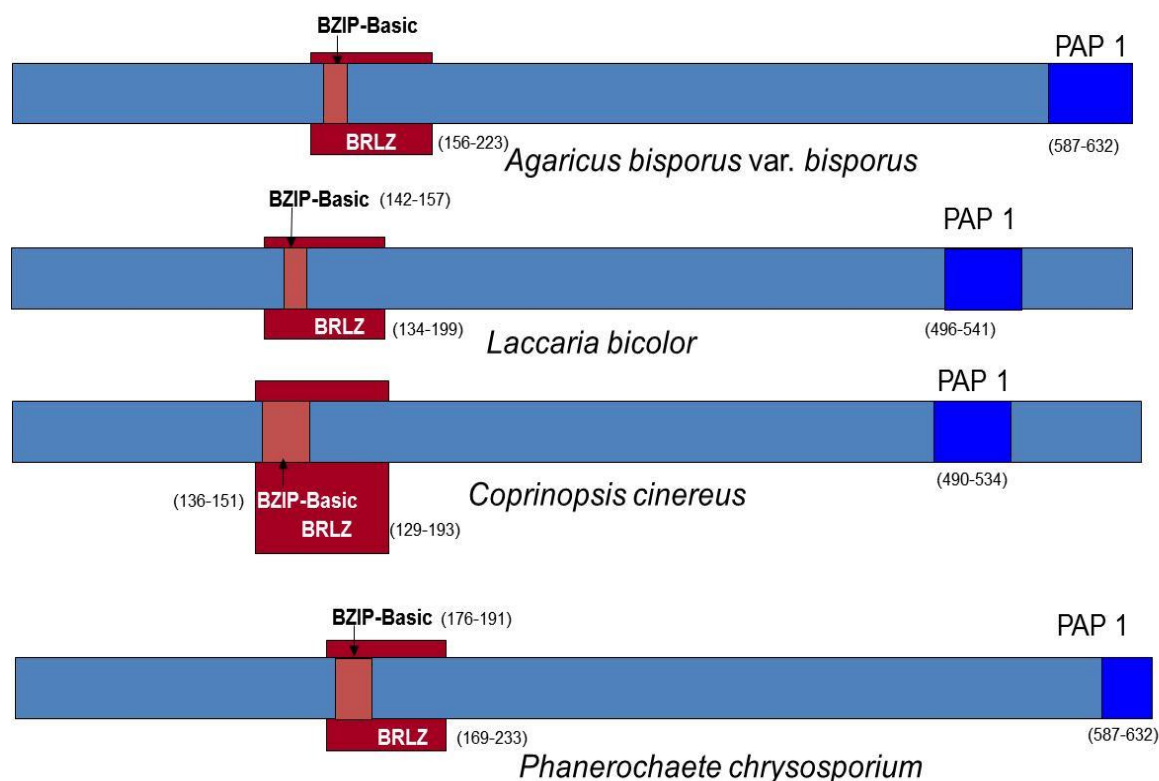


Figure 2. Annotation of the gene 028-1 of *A. bisporus* var. *bisporus* and orthologs in *Laccaria bicolor* (JGI protein ID: 66554), *Coprinopsis cinerea* (XP_001828489), *Phanerochaete chrysosporium* (Prot ID 7851). Three domains were first identified with InterProScan software (v4.8). The overall structure is conserved which helped us to find the beginning of the gene. BRLZ - basic region leucin zipper (SMART method; identifier: SM00338). BZIP-Basic (PROSITE method; identifier: PS00036). PAP1 (PFAM method; identifier: PF08601).

The determination of the primary sequence of 028-1 allowed progress in the identification of its role. After performing a research of homology with already identified genes in Search database Reference proteins (ref seq_protein) using BlastP and PSI-BLAST, matches were found with a hypothetical protein CC1G_08635 from *C. cinerea*: 71 % coverage and *E*-value 9e-32, identities of 51 %, and with other Basidiomycota proteins. These sequences were aligned with MUSCLE (Supplementary Figure 1a and 1b). A BLASTP in NCBI allowed identifying a homolog in yeasts: AP-1-like transcription factor YAP1 (YAP1p).

Supplementary Figure 1

Figure 1a

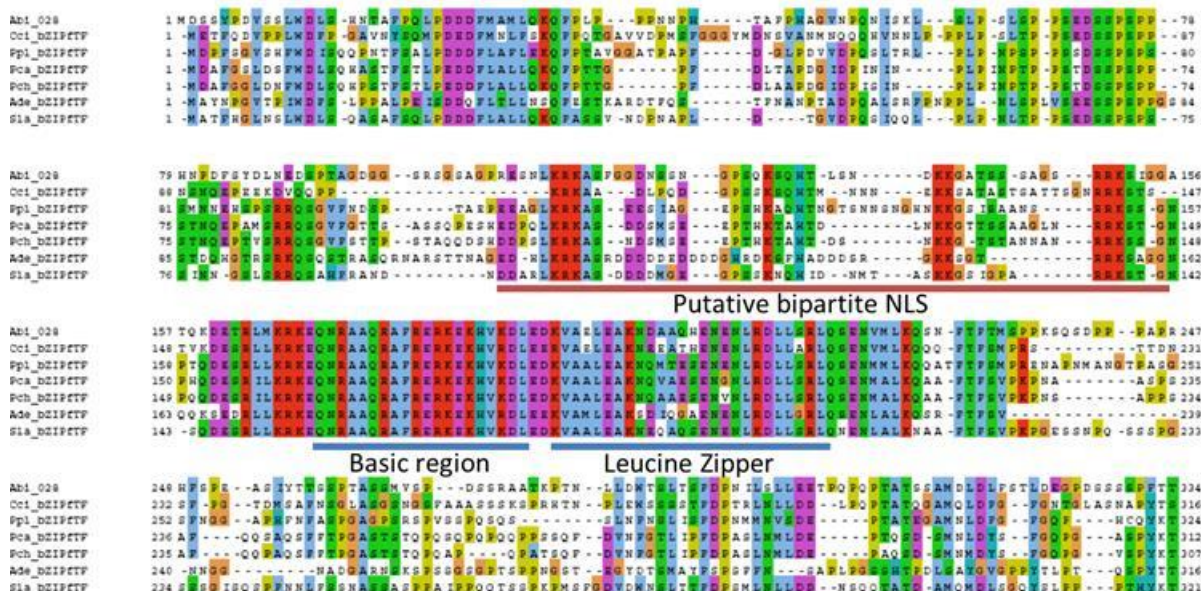
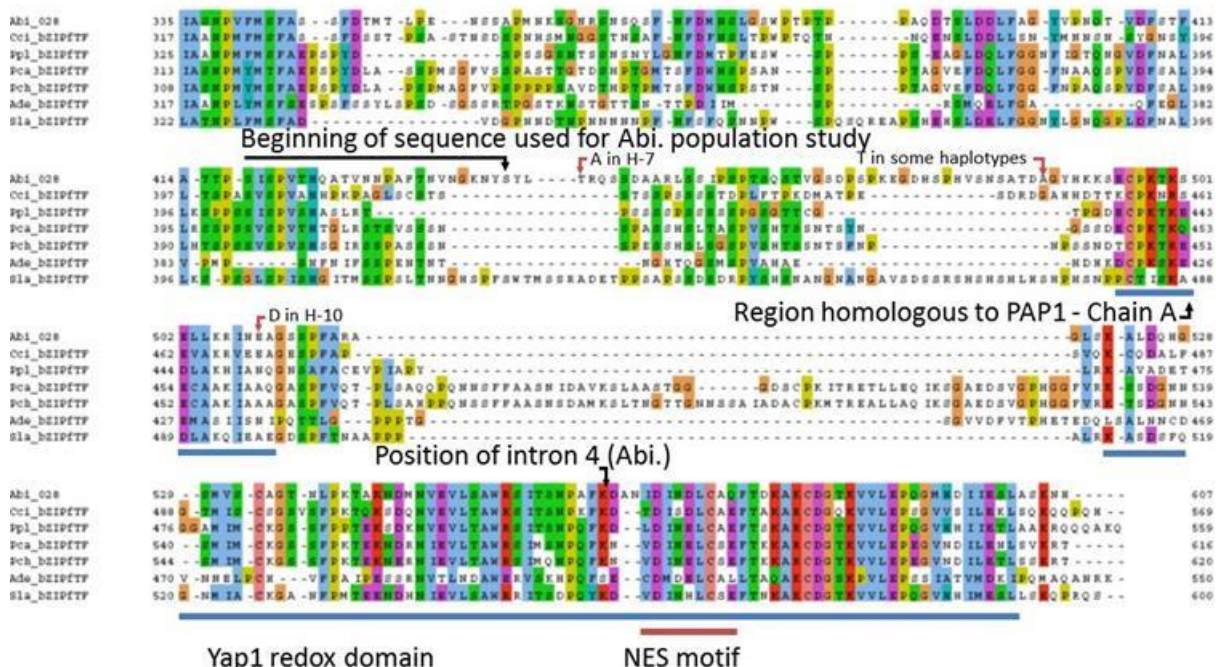


Figure 1b



Supplementary Figure1: 1a and 1b. Sequences alignment of Basidiomycota proteins encoded by 028-1 gene homologs. The two domains, B_ZIP1 (basic region + leucine zipper) and YAP1 redox domain (PAP1 chain B) are localized, based on NCBI Conserved Domain database (*A. bisporus* B_ZIP1 Eval= 8.37e-06, *Phanerochaete carnosus* PAP1 Eval=3.66e-04). Putative bipartite NLS motifs were localized using cNLS mapper and by alignment with YAP1 (cf. SFigure 2). A NES motif was deduced by

alignment with YAP1 (cf. SFigure 4). An indel of 42 to 48 amino acids, just before YAP1 redox domain, distinguish *Phlebioid* clade (*Phanerochaete*) of Polyporales from *Antrodia* clade and all other Basidiomycota tested. In addition to the two domains, high level of identity is found between these Basidiomycota sequences before and after B_ZIP1 domain which confirms the homology between these sequences. A very low level of identity have been found in the sequences localized between the two domains when Ascomycota and Basidiomycota putative homologs are compared and it wasn't possible to align these intermediate sequences except for region PAP1 chain A (cf. SFigure 3). The position of the beginning of the sequence used for *A. bisporus* population study is indicated but the end of this sequence is inside the 3'UTR of the gene. A.bi_028, *A. bisporus* EKV52013; Cci_bZIPpTF, *Coprinopsis cinerea* B_ZIP family transcription factor XP_001828489; Ppl_bZIPpTF, *Postia placenta* Prot ID 93814-mod (annotation modified); Pca_bZIPpTF, *Phanerochaete carnosae* EKM60492; Pch_bZIPpTF, *Phanerochaete chrysosporium* Prot ID 7851-mod; Ade_bZIPpTF, *Auricularia delicata* EJD55397; Sla_bZIPpTF, *Serpula lacrymans* EGN94090

Among Agaricales, the two first proteins containing the YAP1 redox domain to be introduced in UniProtKB database were, the putative uncharacterized protein A8N0T8 from *Coprinopsis cinerea* and the *A. bisporus* protein sequence **C4PFX0** (ACR25139.1 in GenBank) from this work. Two domains and two motifs present in YAP1p were identified in *A. bisporus* 028-1: the bZIP domain with two regions, the YAP1 redox domain, one putative NLS and two putative NES motifs.

The bZIP domain contains a basic region mediating sequence-specific DNA-binding followed by a leucine zipper region required for dimerization. PAP1p is an orthologue of YAP1p in *Schizosaccharomyces pombe* [Rodrigues-Pousada *et al.* 2004] or the YAP1p closest functional homolog, involved in drug resistance and oxidative stress response [Goudot *et al.* 2011]. The 9 amino acids (R-82, K-83, Q-85, N-86, R-87, A-89, Q-90, R-94 and R-96) engaged in salt bridges or hydrogen bonds with either bases or phosphate groups of DNA in PAP1p/DNA crystallographic complex [Goudot *et al.* 2011] are all conserved in *A. bisporus* 028-1 (Figure 3, Supplementary Figure 2c).

The two *S. cerevisiae* YAP family-specific residues, a glutamine Q-73 and an alanine A-80, that differ from R-234 and R-241 of the yeast AP-1 transcription factor Gcn4p [Rodrigues-Pousada *et al.* 2004], are conserved and correspond respectively to 028-1 Q-170 and A-177 (Supplementary Figure 2). Consequently the 028-1 protein is a member of YAP family of AP-1 transcription factors and should have the same DNA binding specificity as PAP1P. The binding sites of YAP family members, Yap Response Element (YRE), are composed of two TTAC "half sites" positioned either in an adjacent (TTACCGTAA referred as YRE-A) or in an overlapping fashion (TTA(C/G)TAA referred as YRE-O) [Goudot *et al.* 2011]. These authors found that a supplementary adenine was present in 5' of the consensus sequence of many

YRE motifs. As PAP1p transcription factor (TF) interacts with both 7 (YRE-O) and 8 (YRE-A) base pair YREs, the same specificity is expected for 028-1 protein.

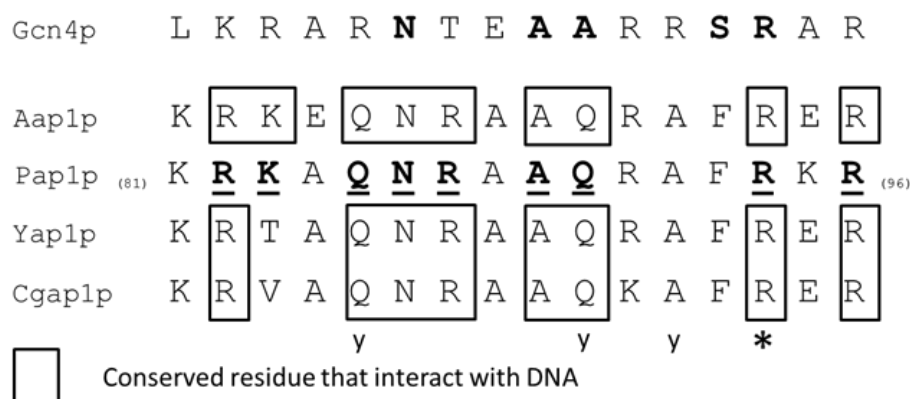
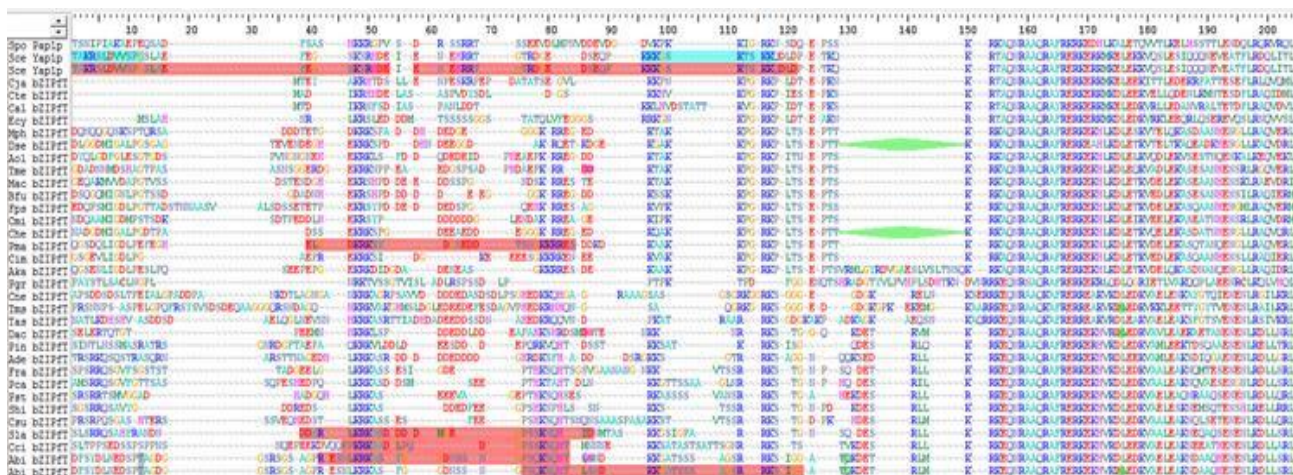


Figure 3. Sequence alignment of the Basic Region (BR) of bZIP domain of AP-1 like transcription factors. Aap1p (028-1 protein) BR is compared with Ascomycetes homologous domains from YAP family transcription factors (PAP1p - *Schizosaccharomyces pombe*, YAP1p - *Saccharomyces cerevisiae*, Cgap1p - *Candida glabrata*) and JUN family (Gcn4p - *Saccharomyces cerevisiae*). Amino acids underlined interact with DNA in PAP1p/DNA crystallographic complex [Goudot *et al.* 2011] and are all conserved in *A. bisporus* Aap1p. Positions in bold in Gcn4p are those common to most bZIP family members. An invariant arginine, at a position labeled with a star, could interact with the central guanine in the Gcn4p/DNA complex (DNA consensus sequence ATGA(C/G)TCAT) [Ellenberger *et al.* 1992; Joo *et al.* 2011] or in the PAP1p/DNA complex (one of the two DNA consensus identified TTACGTAA) [Goudot *et al.* 2011]; indicate three positions where amino acids are specific to YAP family.

The sequence of the basic region of the bZIP domain is conserved among all *Agaricomycetes* (Sebacinales, Auriculariales, Polyporales, Corticiales, Russulales, Boletales, Agaricales) and *Dacrymycetes* putative TF mentioned in Supplementary Figure 2, the DNA binding specificity of these sequences should be also the same as PAP1P. In 028-1 leucine zipper region, the conserved leucines (or other residues) at position *d* in a helical wheel diagram of the coiled coil and typically hydrophobic residues at position *a* of the coiled coil are the same as those of YAP1p, or of the two Ascomycota homologs *Candida albicans* Cap1P or *S. pombe* PAP1p [Rodrigues-Pousada *et al.* 2004] indicating a typical functional leucine zipper. The two functional regions of bZIP domain are present in *A. bisporus* 028-1 and well conserved in Basidiomycota homologs.

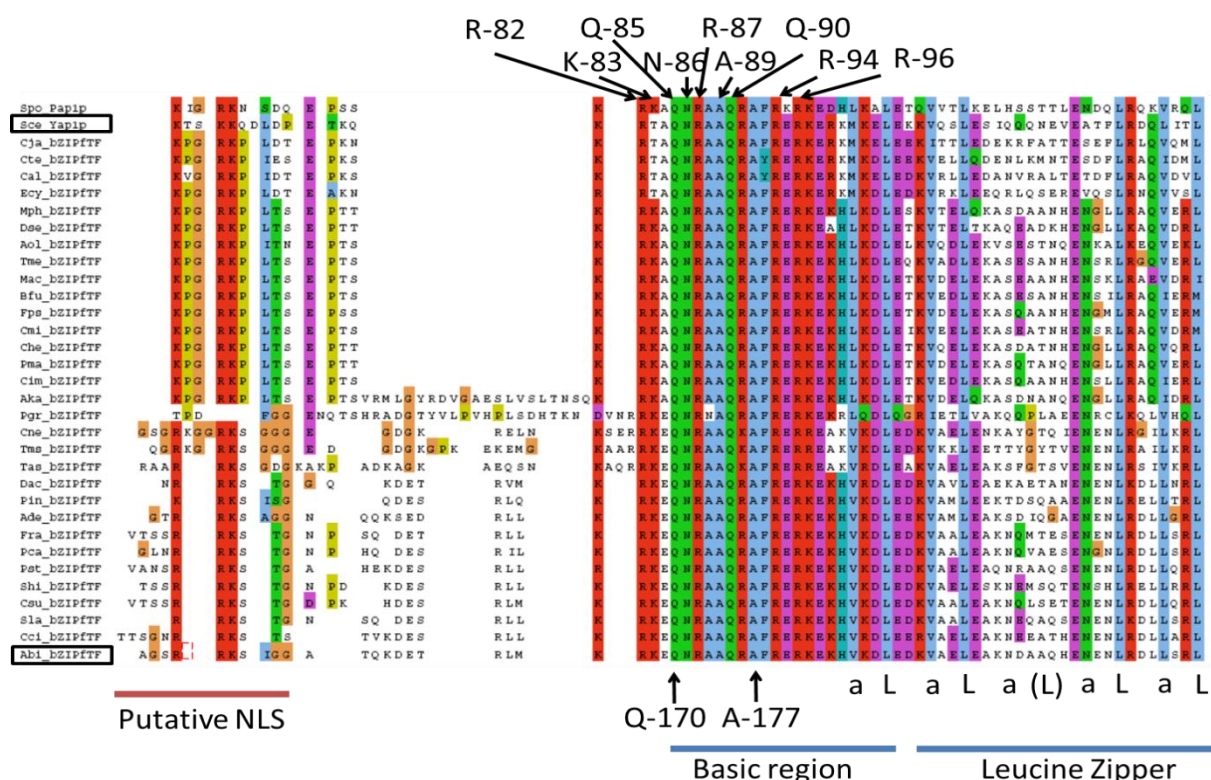
Figure 2a



	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sho_Panin	TEN	IF	IAKAR	FEQ	QAD				
Sho_Yarin	TAKRS	LDVV	SG	SLAR					
Cja_bEiPpT			PSAS	HAKR	QFV	S	D	R	SRRT
Cte_bEiPpT			FKQ	SAS	MDR	E	I	N	RRRT
Cal_bEiPpT			MTEY	AKH	IDS	LL	E	N	SKRRER
Boy_bEiPpT			MAD	IKH	DR	LAS		A	SVDSYL
Mph_bEiPpT			MTL	IKH	FD	IAS		D	SS
Dae_bEiPpT			NR	LKR	SLD	DDM		T	SSSSSSSS
Aol_bEiPpT			DDDT	TG	DKR	FA	D	DM	DEGR
Tae_bEiPpT			TEV	NDN	EKR	ED	DMN	DEEGD	
Mac_bEiPpT			EVN	NDN	EKR	EL	FD	D	QDEID
Sfu_bEiPpT			ASN	SG	ERD	EKR	ENFR	EA	EDG
Ppe_bEiPpT			AST	END	PD	DE	E	DS	SG
Chai_bEiPpT			DA	DN	EKR	SHD	DD	D	E
Che_bEiPpT			EDQ	EN	IDL	PG	TSD		
Psa_bEiPpT			QSD	QL	IDL	PE	FEH		
Cim_bEiPpT			QSE	EV	L	IDL	PG		
Aka_bEiPpT			QSEN	L	IDL	ES	LEQ		
Por_bEiPpT			RAY	LS	AC	LN	GL		
Che_bEiPpT			AR	SD	DS	LT	IE	AL	GR
Tao_bEiPpT			RS	NN	AS	RL	DQ	[15]	Q
Tao_bEiPpT			NAT	LK	DN	SHV	AS	DDSD	
Dac_bEiPpT			SEL	RT	QT	T			
Pin_bEiPpT			S	INT	LS	SM	AS	RAT	
Ade_bEiPpT			TS	R	Q	S	Q	S	TR
Fra_bEiPpT			S	R	R	Q	S	Q	S
Fca_bEiPpT			AM	S	R	Q	S	Q	S
Pat_bEiPpT			SR	S	R	T	S	M	V
Shi_bEiPpT			SR	S	R	Q	S	A	V
Cou_bEiPpT			SR	S	R	Q	S	A	V
Slr_bEiPpT			SR	S	R	Q	S	A	V
Col_bEiPpT			SR	S	R	Q	S	A	V
Abi_bEiPpT			SR	S	R	Q	S	A	V

Putative NLS

Figure 2c



Supplementary Figure 2. Putative NLS and B_ZIP1 domains of Basidiomycota and Ascomycota homologs of YAP1 and *O28-1*. **SFigure 2a.** Alignment overview. The B_ZIP1 domain is well conserved among Ascomycota and Basidiomycota. A bipartite NLS motif has been found experimentally on YAP1 (Sce) (blue in first line). We have tried to deduce a putative NLS position in Abi by homology (alignment) of sequences and using NLS Mapper software. For alignment we have found homologs belonging to Saccharomycotina as yeast (Cja, Cte, Cal, Ecy), Pezizomycotina (Mph, Dse, Aol, Tme, Mac, Bfu, Fps, Cmi, Che, Pma, Cim, Aka), Pucciniomycotina (Pgr), Agaricomycotina (Tremellales – Cne, Tms, Tas, Dacrymycetales – Dac, Sebaciales – Pin, Auriculariales – Ade, Polyporales – Fra, Pca, Corticiales – Pst, Russulales – Shi, Boletales – Csu, Sla, Agaricales – Cci, Abi). Intron positions are indicated in Dse, Tme, Che, Tms, Dac and Abi sequences using the convention proposed by Billette *et al.* [2011]. Partial or total transformation of an intron (green diamond in Dse and Che sequences) to an exon could be at the origin of sequence elongation in Basidiomycota on the N-terminal side, just beside the B_ZIP1 domain. In Aka_bZIPTF, the sequence VRMLGYRDVGAESLVSLTNSQ corresponds certainly to an error of annotation: It begin by GTACG and finish by AG on the gene sequence (BACL01000125:1174-1236) and is exactly at the same place as the intron found on Dse and Che sequences.

NLS Mapper score for bipartite NLS (sequences highlighted in red) were 2.6, 3.9, 9.3, 10.2, 8.5, 5.6 and 4 for Sce N-terminal, Sce C-terminal, Pma, Sla, Cci, Abi N-terminal, Abi C-terminal respectively. Pma, Sla, Cci, Abi N-terminal predicted NLS are located at the same position and have the best scores. The consensus sequence LKRKAS, on the N-terminal side of the putative NLS, is also conserved in all *O28-1* protein homologs belonging to Polyporales, Corticiales, Russulales, Boletales and Agaricales analyzed

here but *Coprinopsis cinerea* (PKRKAA). For Tremellales, a putative NLS may exist at another position as the Tms sequence RKGRKSGGGEDGDGKGPKKEKEMGKAARRK has a score of 6.6 with NLS mapper.

NLS Mapper prediction doesn't fit exactly experimentally identified NLS in yeast but it covers it. This difference exists also for the yeast Pho4p, another target protein of Pse1: SANKVTKNKSNSPYLNKRRGKPGPDSATSLFELPDS is the experimental determined NLS and KRRGKPGPDSATSLFELPDSVIPTPKPKPKPK is the best cNLS Mapper prediction (score 4.9) for a bipartite NLS. To design their software, Kosugi *et al.* (2009) selected peptides bound by importin alpha. They screened a library of thioredoxin - green fluorescent protein (Trx-GFP) fused with various NLS peptides using a newly developed universal GFP expression system. The NLS activity was scored on a 10-point scale based on GFP localization phenotypes that can be only nuclear (score 10) to cytoplasmic (score 1). They demonstrated that the consensus basic patterns of the classic NLSs are not always required for activity. By example for bipartite NLS, three peptides in Kosugi's article (Figure S6A - peptide 222a KRKA EYAHRIAPPSKR and peptide 124a KRRAPFPDENASPSKK Figure S6C - peptide 62y RKRTHDEL CGRYPSRG) active in yeast are not conform to consensus sequence defined as (K/R)(K/R)X₁₀₋₁₂(K/R)_{3/5} where (K/R)_{3/5} represent at least three of either lysine or arginine of five consecutive amino acids and X₁₀₋₁₂, any 10-12 amino acids. These three peptides have one more (K/R) residue on the N-terminal region and less than three lysines or arginines among the five consecutive amino acids on the C-terminal region. From this analyze, we can deduce that part or the totality of a putative bipartite NLS is present on the Abi sequence RESNLKRKASF GGDNSNGPSQKSQHTLSNDKKGATSSSAGSRRK SIGG.

The Threonine in grey (Thr-93) is replaced by an Isoleucine in Abi var *burnettii* JB137-S8 genome (Protein Id 144436). Sce_YAP1, *Saccharomyces cerevisiae* DAA09892, Cja_bZIPpTF, *Cyberlindnera jadinii*_BAE48266, Cte_bZIPpTF, *Candida tenuis*_EGV63639, Cal_bZIPpTF, *Candida albicans*_XP_721702, Ecy_bZIPpTF, *Eremothecium cymbalariae*_XP_003645961, Mph_bZIPpTF, *Macrophomina phaseolina*_EKG11847, Dse_bZIPpTF, *Dothistroma septosporum*_EME48873, Aol_bZIPpTF, *Arthrobotrys oligospora*_EGX43328, Tme_bZIPpTF, *Tuber melanosporum*_XP_002837914, Mac_bZIPpTF, *Metarhizium acridum*_EFY90531, Bfu_bZIPpTF, *Botryotinia fuckeliana*-CCD34878, Fps_bZIPpTF, *Fusarium pseudograminearum*_K3V4Q6_FUSPC, Cmi_bZIPpTF, *Cordyceps militaris*_G3JUL9_CORMM, Che_bZIPpTF, *Cochliobolus heterostrophus*_Q5J7N6_COCH, Pma_bZIPpTF, *Penicillium marneffei*_XP_002145732, Cim_bZIPpTF, *Coccidioides immitis*_XP_001247611, Aka_bZIPpTF, *Aspergillus kawachii*_GAA85896, Pgr_bZIPpTF, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*_XP_003320044, Cne_bZIPpTF, *Cryptococcus neoformans*_XP_778215, Tms_bZIPpTF, *Tremella mesenterica*_EIW70727, Tas_bZIPpTF, *Trichosporon asahii*_K1VEC3, Dac_bZIPpTF, *Dacryopinax* sp._EJT99040, Pin_bZIPpTF, *Piriformospora indica*_G4TFT1_PIRID, Ade_bZIPpTF, *Auricularia delicata*_EJD55397, Fra_bZIPpTF, *Fibroporia radiculosa*_CCL99636, Pca_bZIPpTF, *Phanerochaete carnosa*_EKM60492, Pst_bZIPpTF, *Punctularia strigosozonata*_EIN13303, Shi_bZIPpTF, *Stereum hirsutum*_EIM83320, Csu_bZIPpTF, *Ceriporiopsis subvermispora*_EMD41389, Sla_bZIPpTF, *Serpula lacrymans*_EGN94090, Cci_bZIPpTF, *Coprinopsis cinerea*_XP_001828489, Abi_bZIPpTF, *Agaricus bisporus*_EKV52013

SFigure 2b and 2c. Detail of the alignment. On the bZIP sequence the five amino acids (N-74, A-77, Q-78, F-81 and R-82 in Sce_YAP1) known to make contact with DNA in Yap family in yeast are conserved in Abi_bZIPpTF and in all the sequences analyzed here but Cte_bZIPpTF and Cal_bZIPpTF where Phenylalanine (F-81) is replaced by a Tyrosine Y as in other members of yeast Yap family (Yap5 and Yap7). The two *S. cerevisiae* Yap family-specific residues, a glutamine Q-73 and an alanine A-80 are conserved (they are replaced by two Arginine R in Gcn4 the typical yeast bZIP transcription factor). This demonstrates that all these sequences belong to Yap family among the bZIP Transcription Factor family (bZIPpTF). In Yap8p N-74 from YAP1p is replaced by a L and A-77 by a S. In the leucine zipper, the typical positions of the coiled coil (Leucine at position d and hydrophobic residues at position a in a helical wheel diagram) are indicated (Rodrigues-Pousada *et al.* 2004).

InterProScan in InterPro database allowed identification of the YAP1 redox domain IPR023167 (E-value: $3.7E-23$) and the region called Transcription factor PAP1 IPR013910 (E-value: $3e-07$) in 028-1 of *A. bisporus*. PAP1 region was described on *PAP1p* (AP-1-like transcription factor QO1663 of *S. pombe*). PAP1 signature is used to build the Pfam family PF08601. The homologous sequences of the chains A and B of *PAP1* and *YAP1* genes were identified, but the *A. bisporus* sequence homologous to chain A is rather different. The YAP1 redox domain, correspond to the chain B of transcription factor PAP1.

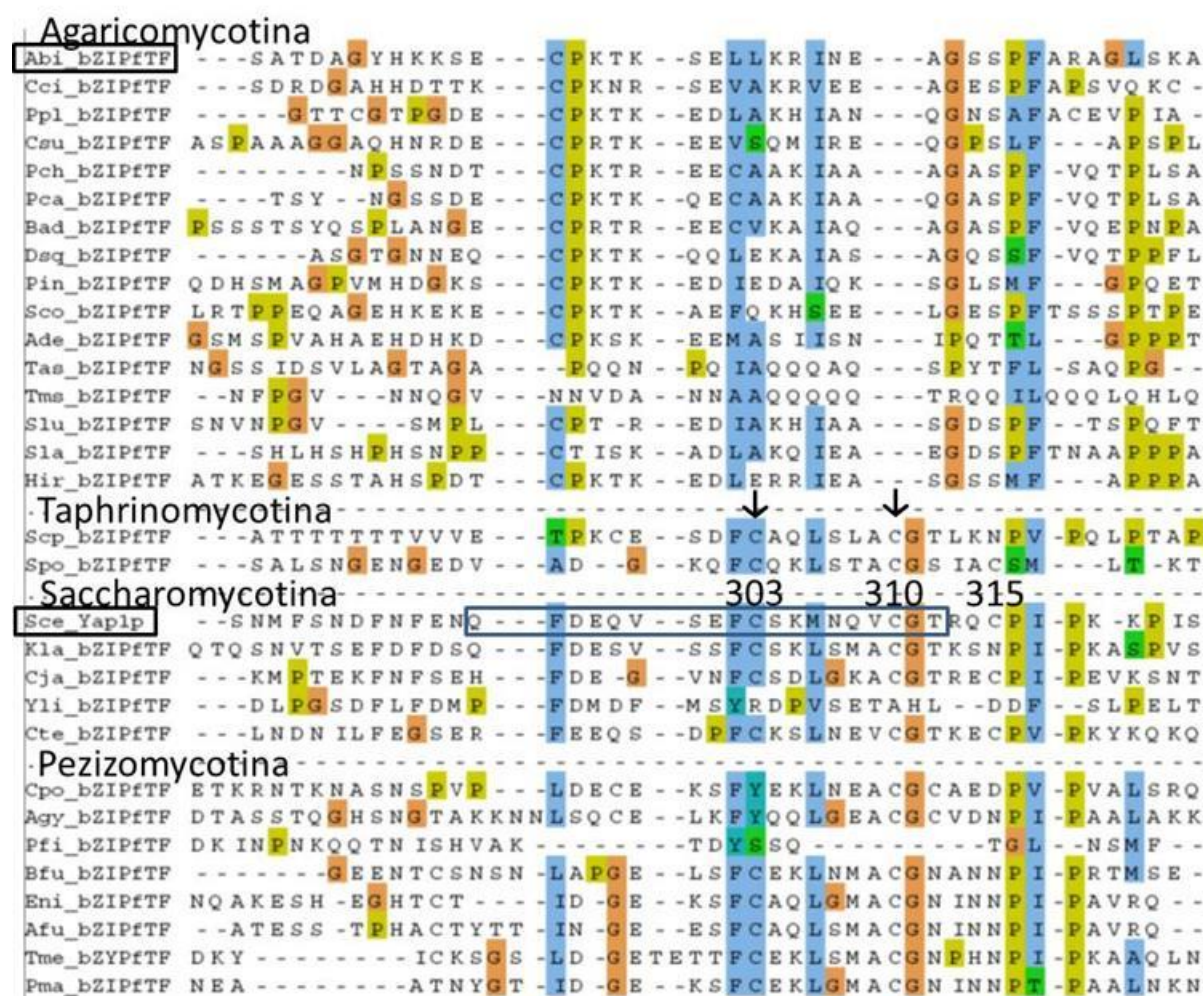
A homology with chain A of PAP1 (N-terminal Cysteine-riche domain (n-CRD)) was difficult to find. By successive pairwise comparison with BlastP we found a putative homology between region PAP1 chain A from *Saccharomyces cerevisiae* YAP1p DAA09892 (273-323) and selected regions from bZIP fTF of *Saitoella complicata* (Taphrinomycotina), *Schizophyllum commune*, *A. bisporus* 028-1 (Table 2).

Compared putative chain A sequences	accession number of protein complete sequence	Identity	Similarity	Number of positions	Blastp two sequences result	
<i>S. cerevisiae</i> Yap1p	DAA09892	0.38	0.75	24	Sbjct 18 SEFCSKMNQVCGTRQCPIPKKPIIS 41 S+FC+++ CGT + P+P+ P +	
<i>S. complicata</i> _bZIPfTF	15991				Query 8 SDFCAQLSLACGTLKNPVPQLPTA 31	
<i>S. complicata</i> _bZIPfTF	15991	0.36	0.82	11	Query 4 PKCESDF 10 PK +++F	Query 22 KNPV 25 ++P
<i>S. commune</i> _bZIPfTF	EF191622				Sbjct 17 PKTKAEF 23	Sbjct 32 ESFF 35
<i>S. commune</i> _bZIPfTF	EF191622	0.57	0.63	30	Query 7 QAGEHKEKECPKTKAEFQKHSEELGESPF 36 AG HK+ ECPKTK+E K E G SPF	
<i>A. bisporus</i> _bZIPfTF (028-1)	EKV52013				Sbjct 4 DAGYHKKSECPKTKSELLKRINEAGSSPFA 33	
<i>S. cerevisiae</i> Yap1p	DAA09892	0.39	0.57	28	Query 21 NQFD-EQVSEFCSKMNQVCGTRQCPIPK 47 D E + FC K++ CG PIPK	
<i>T. melanosporum</i> _bZIPfTF	XP_002837914				Sbjct 28 GSLDGETETTFCEKLSMACGNPHNPIPK 55	

Table 2. Inferred homologies for Chain A of Transcription factor PAP1 region between Saccharomycotina (*Saccharomyces cerevisiae*), Taphrinomycotina (*Saitoella complicata*), Agaricomycotina (*Schizophyllum commune*, *Agaricus bisporus*) and between Saccharomycotina (*S. cerevisiae*) and Pezizomycotina (*Tuber melanosporum*). For phylogenetic tree of Dicyria see <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>

An alignment between 30 sequences homologous to region PAP1 chain A of *S. cerevisiae* in Dicyria was obtained (Supplementary Figure 3). The most conserved part of chain A in PAP1 region in Saccharomycotina (pfam08601) correspond to YAP1 sequence 294 - QFDEQVSEFCSKMNQVCGT - 312 that includes the two Cysteines involved in disulfide bonds present in the oxidized form of YAP1p (Cys303-Cys598 and Cys310-Cys629) Wood, Storz [Wood *et al.* 2004]. The alignment in Supplementary Figure 3 indicates that these two Cysteine positions (Cys303 and Cys310) are conserved in many (but not all) Saccharomycotina, Taphrinomycotina and Pezizomycotina. Therefore the redox sensing

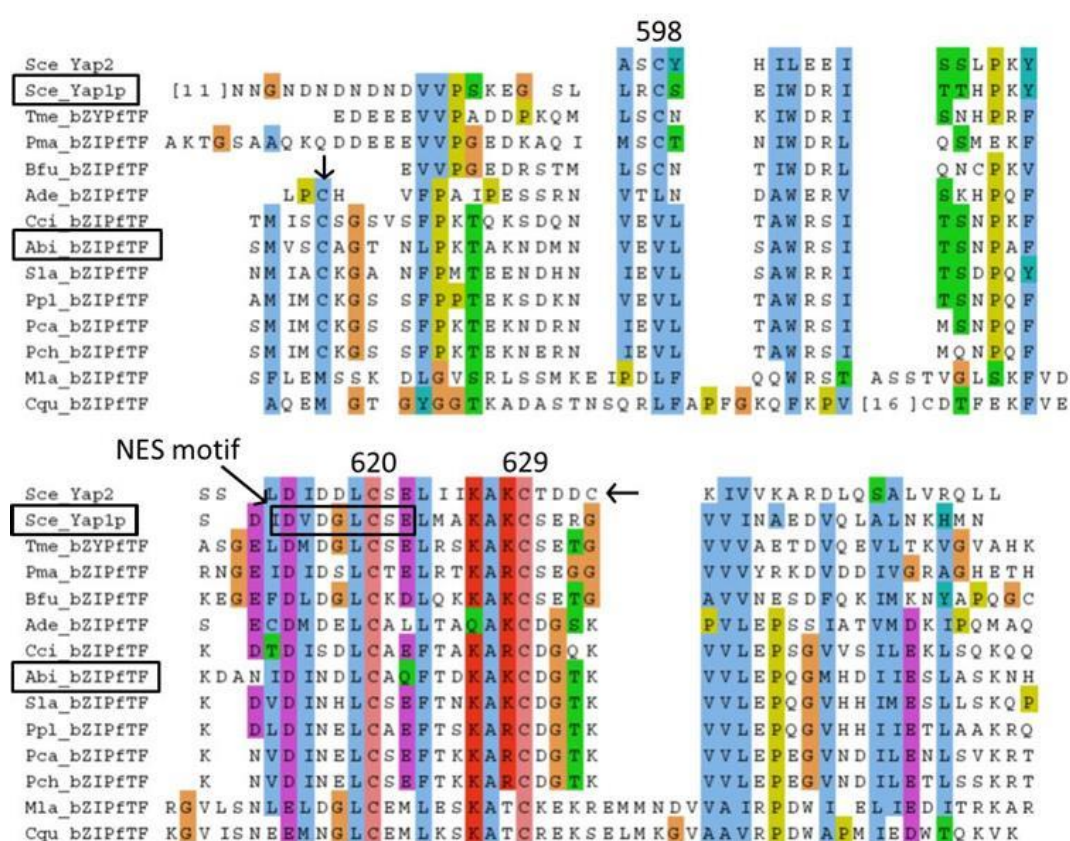
mechanism involving the disulfide bonds formation is probably present for all these Ascomycota YAP1p homologs (with chain A two Cys positions conserved) and this mechanism was probably present in the ancestor of all Ascomycetes. This part of chain A is homologous to 028-1 sequence 495 - ECPKTKSELLKRINEA - 510. The alignment indicated no homology between Cysteines of chain A from Sce_YAP1p (C-303, C-310) and those of 028-1. None of these disulfide bonds existed in *A. bisporus*, neither in other Basidiomycota bZIP fTF studied. The redox sensing process in Basidiomycota bZIP fTF studied involves another mechanism than that described in *S. cerevisiae*.



Supplementary Figure 3. Sequence alignment of putative chain A of PAP1 region. The most conserved part of chain A is framed and Cysteine positions in YAP1p are specified. The arrows indicate the two Cysteine positions conserved in many bZIPfTF sequences in the three subphyla of the Ascomycota but absent in Basidiomycota species studied. A.bi_bZIPfTF, *A. bisporus* EKV52013 (028-1), Sce_YAP1, *Saccharomyces cerevisiae* DAA09892, Bad_bZIPfTF, *Bjerkandera adusta*_jgi_74104 (Protein ID in JGI portal <http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf>), Dsq_bZIPfTF, *Dichomitus squalens*_EJF58795, Sco_bZIPfTF, *Schizophyllum commune*_EFI91622, Slu_bZIPfTF, *Suillus luteus*_jgi_809202, Hir_bZIPfTF, *Heterobasidion irregulare*_jgi_443323, Scp_bZIPfTF, *Saitoella complicata*_jgi_15991, Spo_bZIPfTF, *Schizosaccharomyces pombe*_NP_593662, Kla_bZIPfTF, *Kluyveromyces lactis*_XP_451077, Yli_bZIPfTF, *Yarrowia lipolytica*_XP_504945, Cpo_bZIPfTF, *Coccidioides posadasii*_XP_003065816, Agy_bZIPfTF, *Arthroderma gypseum*_XP_003169689, Pfi_bZIPfTF.

bZIPfTF, *Pseudocercospora fijiensis*_EME88330, Eni_bZIPfTF, *Emericella nidulans*_Q5AW17, Afu_bZIPfTF, *Aspergillus fumigatus*_Q4WMH0. Other sequence and species names are explained in supplementary Figure 1 (Ppl and Pch) and 2.

The YAP1 redox domain, correspond to the chain B of transcription factor PAP1. The middle of this C-terminal Cysteine riche domain (c-CRD) is very similar between Ascomycota (including YAP1p) and *O28-1*, and position of YAP1p Cysteine C-629 is conserved in *O28-1*. Nevertheless the region surrounding the Cysteine on the C-terminal side of YAP1 redox domain in YAP1p is not homologous to the corresponding region of *O28-1* (Supplementary Figure 4).



Supplementary Figure 4. Sequence alignment of the YAP1 redox domain, corresponding to the chain B of PAP1 region. In YAP1p, under oxidizing conditions, the formation of two disulfide bonds (C303-C598 and C310-C629) masks the NES motif (Wood *et al.* 2004). The exportin Crm1 cannot bind YAP1p which is retained in the nucleus and activates the target genes. The YAP1 redox domain and the NES motif are well conserved among Ascomycota for Pezizomycotina (Tme, Pma, Bfu) and among Basidiomycota, better for Agaricomycotina than for Pucciniomycotina (Mla, Cqu) bZIPfTF studied. A Cysteine homologous to Sce_C-629 is present in *A. bisporus* (C-583), but the formation of a disulfide bond homologous to YAP1P C310-C629 cannot happen as C310 has no homolog in *A. bisporus* *O28-1* (Supplementary Figure 3). For disulfide bond C303-C598, the region surrounding C-598 on the C-terminal side of YAP1 redox domain is not homologous to the corresponding region of *O28-1* and none of these two Cysteines have a homolog in *A. bisporus*. Another Cysteine (vertical arrow), 17 amino acids forward the Cysteine of Ascomycota, could play in Agaricomycotina the role of C-598 from Sce, with a Cysteine in chain A, 8 positions forward Sce-C303 (Supplementary Figure 3).

Experimental demonstration is needed. Position of Cysteine C-620, involved in thiol reactive agents sensing in Sce, is conserved in *028-1* (C-574). NES motif can be predicted in *A. bisporus 028-1* as hydrophobic residues and an acidic residue in between are in conserved positions as in viral and metazoan NES. These positions are conserved in *028-1* Basidiomycota homologs studied. YAP1 redox domain is very similar between YAP1p and Yap2p. But a Cysteine Yap2p-C391 (horizontal arrow) involved in Cadmium sensing (Azevedo *et al.* 2007) is absent in YAP1p and in all bZIPfTF YAP1 homologs studied. Mla_ bZIPfTF, *Melampsora laricis-populina_jgi_92181*, Cqu_ bZIPfTF, *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme_jgi_717477*. Other sequence and species names are explained in supplementary Figure 1, 2 and 4.

The YAP1p, Nuclear Export Signal (NES) motif is nested in the YAP1 redox domain. It contains hydrophobic residues and several acidic residues in between, at positions conserved in Ascomycota homologs (Supplementary Figure 4). Most of these characteristics are shared with viral and metazoan NES [Yan *et al.* 1998] and are conserved at the same position in YAP1 redox domain of *028-1* protein. Therefore we can deduce the presence of a putative NES signal in *028-1* protein at position 568-576. Another putative NES motif was found on *028-1* protein using NetNES1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) at position 313-324. In yeast an exportin, Crm1p, recognizes the NES of the reduced form of YAP1P and directs it out of the nucleus. We have found a homolog of Crm1p among the gene models of the genome of *A. bisporus* [Morin *et al.* 2012], GenBank accession number EKV50484. This gene has 52% identities and 74% similarities with yeast Crm1p (a.n. DAA08312). It contains an Xpo1 domain, pfam08389 (E_value 2.41 e-46) and an Exportin 1 domain also known as CRM1_C terminal domain, smart01102, (E_value 2.15 e-151). Unlike many member of the family pfam08389, the Xpo1 domain of *A. bisporus* Crm1p-like is exactly at the same position than in yeast exportin 1 (Crm1p) that is close to the N-terminus. *A. bisporus* Crm1p-like is a putative exportin 1 homolog that could link to the NES motif of *028-1*. The mechanism by which YAP2p and YAP8p, the two other yeast proteins having a YAP1 redox domain, and YAP1p react to Cadmium, Arsenic concentration and thiol reactive agent respectively don't involve formation of disulfide bonds ([Azevedo *et al.* 2007; Rodrigues-Pousada *et al.* 2010]). Experiment is needed to control to which stimulus *028-1* protein is able to respond and to determine the mechanism involved.

Next to the BZIP domain of YAP1p a NLS motif enables Pse1p, to bind the protein and to transport it in the nucleus through the nuclear pore complex [Isoyama *et al.* 2001]. Pse1p is an importin beta family member. Using cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) we found a possible location for a putative bipartite importin alpha-dependent nuclear localization signal (NLS) on *028-1* protein sequence near the N terminal side of the BZIP domain: RESNLKRKASFGGDNSSNGPSQKSQHT with a score 5.6

(Supplementary Figure 2a). Another location, for a putative bipartite NLS, was found with cNLS Mapper on 028-1 protein, overlapping the first one, but with a smaller score: PSQKSQHTLSNDKKGATSSSAGSRRKSIGG with a score 4.

As indicated in Supplementary Figure 2 the cNLS Mapper prediction and the experimental NLS localization on YAP1p were slightly different. Moreover the NLS of YAP1p and Pho4p, another target protein of Pse1 in Yeast, didn't fit exactly to the consensus basic patterns of the classic NLSs. Such kind of differences between their model and experimental data were also observed by Kosugi *et al.* 2009, when they designed their software. Analysis of this is given in Supplementary Figure 2. By combining cNLS mapper results and sequence alignment we predicted that 028-1 bipartite NLS could be inside the region 107-155, with one N-terminal region including the sequence LKRKAS and one C-terminal region including the RRK sequence.

The gene models of the genome of *A. bisporus* [Morin *et al.* 2012], contain a homolog of Pse1p, GenBank accession number EKV48756. This gene has 25% identities and 44% similarities with yeast Pse1p (a.n. EIW08583). It contains an Armadillo/beta-catenin-like repeats (ARM domain), cd00020 (E_value 2.39 e-06) and two Heat-like repeats (domain HEAT_EZ) pfam13513 (E_value 6.26e-04 and 3.71e-03). These domains are present and well conserved on the N-terminal side of these two proteins, but there is only one HEAT_EZ domain identified on Pse1p as the second one diverged a little more from the consensus than in Abi_ EKV48756. The C-terminal side of Pse1p is 213 amino acids longer than Abi_EKV48756 which is a putative importin beta family member that could link to the NLS motif of 028-1 and we named it Pse1p-like protein.

As a summary, except for domain PAP1 chain A, for which the Cysteine positions are not conserved, all the domains and motifs of YAP1 can be predict on 028-1 protein sequence. Sequence similarities as well as domain and motif predictions indicated it has the structure of a TF with a sequence specific binding domain and a leucin zipper region. It has a potential sensing capacity with a YAP1 Redox domain and it should be able to transfer in and out the nucleus thanks to the NLS and NES motifs.

Among the 15 *A. bisporus* genes containing a BZIP-basic domain (IPR004827), 028-1 is the only one containing a YAP1 redox domain or a partial PAP1 region (PF08601). Then 028-1 is the YAP1 homolog and could play a similar role in *A. bisporus* than in the yeast. The transcription factor (TF) YAP1p is a central regulator of the response to oxidative stress in *S. cerevisiae* [Rodrigues-Pousada *et al.* 2004; Rodrigues-Pousada *et al.* 2010]. In presence of

H₂O₂, reactive oxygen species (ROS) and Cd, cellular localization of YAP1p is modified and this TF induces expression of genes involved in detoxification of ROS, thiol redox control, production of antioxidants and also cadmium detoxification pathways. However, since a putative common ancestor to *YAP1* and *028-1*, the gene could have evolved differently in Basidiomycota and Ascomycota.

We annotated *028-1* homologs in available genomes of Basidiomycota showing the conservation of the domains in its structure (see Supplementary Figure 1, 2, 4). Alignment of gene sequences showed the high level of identity in the domains B_ZIP1 and YAP1 redox and also, at a lesser level in the sequence located between the two domains and before B_ZIP1 (Supplementary Figure 1). However an indel of 42 to 48 amino acids, between n-CRD and YAP1 redox domain, distinguished *Phlebioid* clad (*Phanerochaete*) of Polyporales from *Antrodia* clade and all other Basidiomycota tested. The important polymorphism found in this gene in Polyporales could be used to control or improve Polyporales phylogeny which is not stabilized yet [Binder *et al.* 2005; Garcia-Sandoval *et al.* 2011]. The high level of identity between Basidiomycota protein tested here indicated they are potentially orthologous proteins. However we have not been able to align the sequence located between the two domains when comparing Basidiomycota with Ascomycota and had great difficulty to find the homologous sequence of PAP1 chain A in Basidiomycota. Therefore the similarities between the inferred structures of *028-1* and YAP1p proteins can be confirmed, without ambiguity, only at the level of the two domains and the NES motif. We demonstrated that the NLS motif has evolved much more in its position and sequence, with an important indel distinguishing Ascomycota from Basidiomycota homologs. All these evolutions may have modified potential interactions with Pse1p-like proteins. All these differences, between Ascomycota YAP1p homologs and Basidiomycota *028-1* protein homologs, indicate that the function of these proteins could have slightly diverged since the ancestor protein. Indeed we have demonstrated the absence of homology between Ascomycota and Basidiomycota studied, for some Cysteines involved in disulfide bond in oxidized form of YAP1p. Moreover Goudot *et al.* [Goudot *et al.* 2011] comparing transcriptional modules (TMs = set of genes whose transcription is modulated by a common transcription factor) of three yeast AP-1 proteins (*S. cerevisiae* YAP1p, *Candida glabrata* Cgap1p and *C. albicans* Cap1p) showed important rewiring in their TMs while their physiological role in response to oxidative stress was conserved.

This survey shows that *028-1* is related to transcription factors activated during stress response in fungi. This homology is not surprising since *028-1* was identified after a temperature treatment on mycelium, and the effect of such treatments on its expression level

has been confirmed for some strains in the present work. *028-1* protein is the *A. bisporus* protein most similar to YAP1p. Even if *028-1 protein* does not regulate export from the nucleus by exactly the same mechanism as YAP1p, it is conceivable that it could play a role in oxidative stress response. [Sugiyama *et al.* 2000] demonstrated a link between heat shock response in yeast and YAP1p-dependant induction of glutathione synthesis. Heat shock stress increases oxygen respiration rate and intracellular oxidation level and YAP1p senses this increase of oxidation level [Delaunay *et al.* 2000] and activates transcription of its target genes.

Based on these observations, *028-1* gene in *A. bisporus* may be considered as a transcription factor involved in regulation of the response to oxidative stress generated by heat shock. It might consequently act during the adaptation phase leading to the thermo-tolerance of some strains. We have named it *aap1* for *Agaricus bisporus* activating protein YAP1-like transcription factor 1 as it is a member of a new sub-family of YAP1-like transcription factors, present in *Agaricomycetes* and *Dacrymycetes* and not able to form disulfide bonds in the same way as YAP1p in oxidized environment.

3-3 Sequence polymorphism of *aap1* in *A. bisporus* strains

Differences in promoter or coding sequences might, however, be involved in the variability of phenotypes observed in the 24 wild strains of *A. bisporus* chosen to represent the three known varieties of this mushroom, var. *bisporus*, var. *burnettii* and var. *eurotetrasporus*, and originating from various European and North American sites (Table 1). Three sequences from homokaryons were added as controls to this sample. *Agaricus bisporus* is an amphithallic species with a secondarily homothallic or heterothallic cycle according to the ploidy level of the spores which can be heterokaryotic (n+n) or homokaryotic (n), respectively. The vegetative mycelium obtained after isolation from the cap is heterokaryotic, except for the homokaryotic variety *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* [Callac *et al.* 1993; Callac *et al.* 2003]. Consequently, a maximum of 59 haplotypes were expected from the studied sample containing 27 heterokaryons, 2 homocaryotic strains and 3 homokaryons. Among them, 54 were identified (Table 1).

Analysis of DNA sequence polymorphism in a gene may be used in molecular ecology research, including gene mapping [Slate *et al.* 2010]. In the 701 bp segments of *028-1* gene analyzed, (GenBank a.n.: FJ940724; position 1 corresponding to position 2097 of total gene in JGIDB: Agabi_varbisH97_2_239429), at least 16 nucleic different haplotypes were present

(Table 1) with 42 polymorphic sites showing the relatively high level of polymorphism of this gene.

93% of these polymorphisms were single-base changes of which 72% were transitions and 28% transversions. 2% were three bases possible for the same site. The other polymorphisms (5%) were 2 insertion-deletion polymorphisms (indels) located in the intron. Väli *et al.* [Vali *et al.* 2008] introduced the use of short indels for genetic analysis of natural populations and stated that indels will form an important source of genetic markers, easy and inexpensive to genotype, for studies of natural populations. Active transposons are believed to be the causes of large Indel polymorphisms in maize [Coe *et al.* 1998]. Insertions and deletions can occur by unequal crossing-over or replication slippage or slipped-strand mispairing [Levinson and Gutman 1997]. Here a haplotype differing by an indel was found in two European strains (H-11 in France and Greece), another haplotype differing by another indel was found in two North American strains (H-7 in Canada and USA), independently of their adaptation to high temperature.

Wang *et al.* 1998 stated that Cytosine residues within CpG dinucleotides are the most mutable sites within the human genome, because most are methylated and can spontaneously deaminate to yield a thymidine residue. Our observations agreed with this model stating a frequent occurrence of the reactions of deamination of the cytosines [Brookes 1999]. 32.5% of the single-base changes (SNP) occurred at dinucleotides CpG, and C \leftrightarrow T substitution where 25% of these SNP, whereas they make up about 13% of the sequence.

Of 27 heterokaryotic strains, at least two (Bs0374 and Bs0679) were homozygotes for the studied part of *028-1* gene. The polymorphism at position 117 and 186 allowed distinguishing some *A. bisporus* var. *burnettii* haplotypes (T for H-8, H-9 and H-10 at position 117 and A for H-8 at position 186) to the haplotypes of the two other varieties. Ten positions (96, 117, 186, 204, 249, 282, 377, 469, 484 and 644) presented a nucleotide only found in at least one nucleus of a strain of *A. bisporus* var. *burnettii* (H-8, H-9 or H-10) and never present in the strains of the other varieties. Only one genotype (H-4) was observed for the two strains of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* that was also present and frequent in the variety *bisporus*. This genotype was found also in one of the nuclei of the intervarietal hybrid (var. *eurotetrasporus* x var. *bisporus*), the wild strain Bs0261.

Analysis of DNA sequence polymorphism in a gene may also contribute to identify nucleotide regions that could be responsible of differences in the gene regulation or properties and to

progress in population and evolutionary studies [Vignal *et al.* 2002; Brumfield *et al.* 2003; Morin *et al.* 2004]. Mutations observed as single nucleotide polymorphisms are abundant and widespread in many species' genomes (coding and non-coding regions), and they evolve in a manner well described by simple mutation models, such as the infinite sites model [Vignal *et al.* 2002]. The relationship between the *A. bisporus* strains, varieties *bisporus*, *burnettii* and *eurotetrasporus* studied in this work was analyzed by generating useful distance matrixes as input to cluster the homokaryons of the different strains (see Table 1) on the basis of their similarity, using the BIONeighbor Joining method (Figure 4). The two strains and the homokaryon coming from an isolated population in the Californian Desert and belonging to the *burnettii* variety presented some variability at the level of nucleic sequences with a minor allele each (H-8, H-9 or H-10). The two heterokaryons from this variety are able to produce mature fruiting bodies at 25 °C (FHT⁺ strains). If *aap1* is responsible for the polymorphism of FHT trait, alleles H-8, H-9 and H-10 could be responsible of FHT⁺ phenotype as they are never found in FHT⁻ strains.

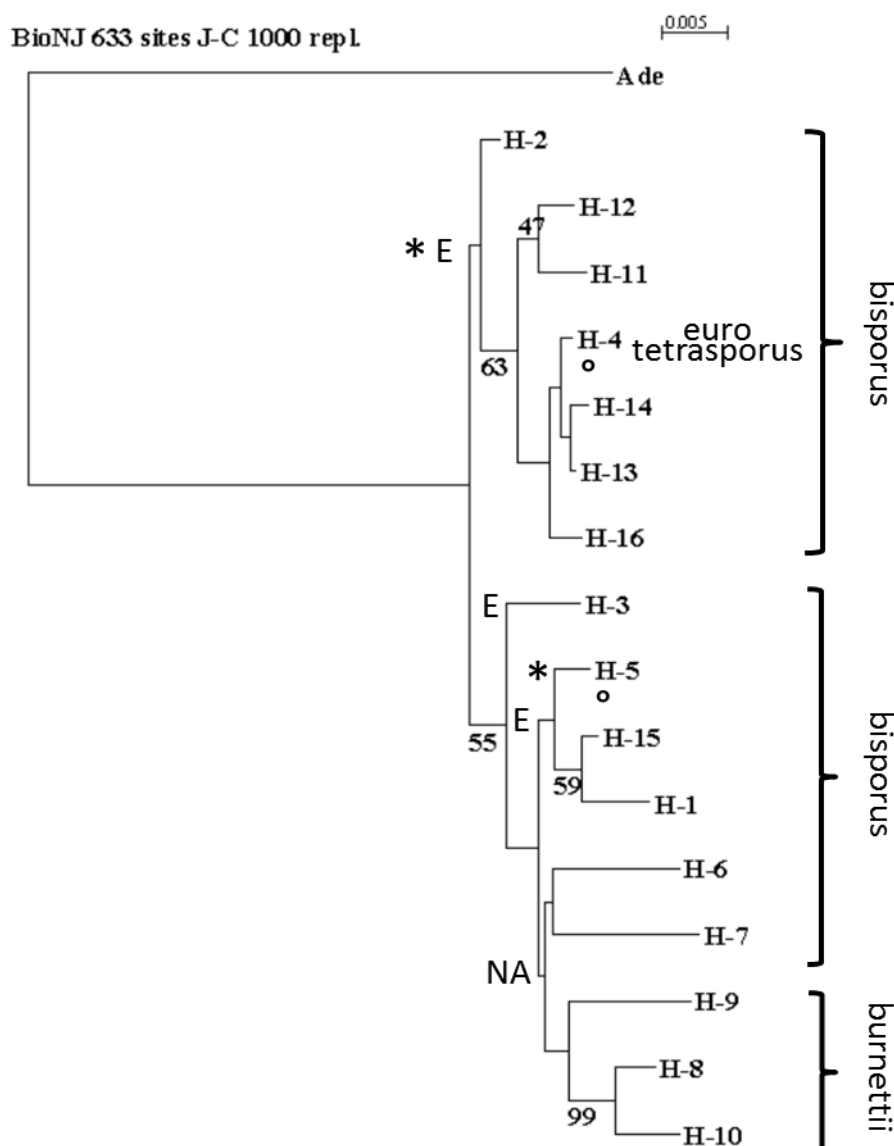


Figure 4. Neighbor Joining tree of *aap1* gene haplotypes of *Agaricus bisporus* strains, obtained by BIONJ analysis using Jukes and Cantor (1969) distance. The tree was rooted by *Agaricus devoniensis* homologous sequence (Ade). Bootstrap values above 45% (1000 replicates) are displayed beside nodes of the tree formed by, H- 1 to H- 16, *A. bisporus* haplotypes (cf. Table 1). Varieties to which belong the stains are indicated (*bisporus*, *eurotetrasporus*, *burnettii*). Origin of strains, European (E) or North American (NA) continent, is mentioned. H-1 is one of the most frequent alleles in Europe but has been found in one Mexican strain (Bs0739). ° below H-4 and H-5 indicate that one stain, Bs0004, having these haplotypes, do not come from Europe but from Canada. This strain or the two *aap1* alleles it contains are probably escaped from culture. * beside the European *eurotetrasporus bisporus* clade and beside H-5, indicate that all these European strains have a threonine at position 47 while all the North American and three other European strains (H-1, H-3 and H-15) have an alanine at this position (position 1 in GenBank a.n. FJ940724 corresponding to position 2097 of total gene in JGIDB: Agabi_varbisH97_2_239429). Position of the root sequence (Ade= *Agaricus devoniensis* BZIP fTF) is not strongly supported. Maximum likelihood method (PHYML) places, in some cases, Ade near H-16.

In the variety *bisporus*, Bs0190 and Bs0661 shared two alleles (H-1, H-4), had the same phenotype (Table 1) but had different expression profiles when comparing primordia and

fruiting bodies at 17 and 25 °C (see below). The haplotypes from the strains able to produce mature fruiting bodies at 25 °C (FHT⁺ strains) were distributed in various branches of the tree with the haplotypes from the FHT⁻ strains. However, two main branches were observed in the tree, but with a low bootstrap value. Two haplotypes, H1 and H4 were the most abundant; 27 and 31 % of the 55 haplotypes identified respectively. H1 appeared to be neutral for the FHT trait, whereas H4 was less represented in FHT⁺ (frequency of 0.18) than in FHT⁻ strains (frequency of 0.38). Fisher's Exact Test [Fisher 1954] for count data showed that these differences were significant with a p-value of 0.95. These observations tend to highlight a contribution of some alleles of *aap1* gene to the regulation of the fructification by the temperature.

In addition, H4 is present only in European strains, but a haplotype of a strain from British Columbia Canada, whereas all the alleles from the American strains are in the lower branch of the tree. Isolates from British Columbia had already been observed genotypically similar to those collected in Europe [Kerrigan *et al.* 1998]. In contrast, the population from forests of *Picea* in the Rocky Mountains of Alberta from where came the other Canadian strain of this study (a FHT⁺ strain) had genotypes that were very different from European and cultivar groups [Xu *et al.* 1997]. Some alleles, at specific positions in the protein sequence, are specific to North American or European continent (Figure 5). The DNA sequence polymorphism of *O28-1* might be a marker of population evolutions but not an efficient marker of a specific adaptation of thermo-tolerant strains that have been found spread in various populations of *A. bisporus* var. *bisporus*.

Due to the significant number polymorphic sites in the coding regions, one can question their functionality. Most of the nucleotide changes in the protein-coding regions were silent; they did not change the amino acid composition of the protein product and have generally been assumed to exert no discernible effect on gene function or phenotype [Komar 2007]. Apart from these synonymous polymorphisms, we identified 3 variable amino-acids positions (T/A-4, T/A-47 and E/D-68), of the deduced polypeptide sequence, leading to four different profiles: P1= TAE, P2 = TTE, P3= AAE, P4= TAD. Alignment of the deduced polypeptide

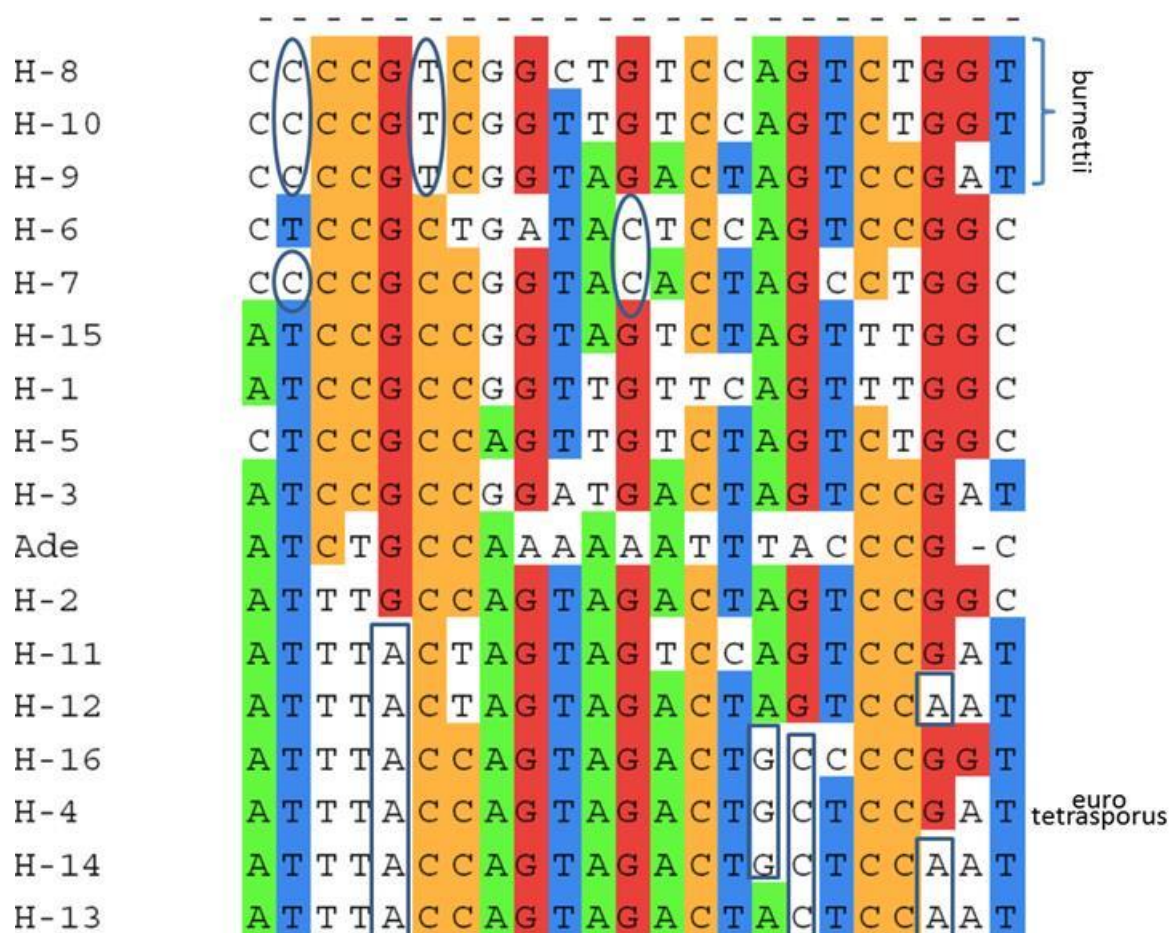


Figure 5. Single nucleotide polymorphisms for parsimony: Polymorphic nucleotide positions with at least two copies of each allele among the 16 haplotypes of *aap1* gene, H- 1 to H- 16 and the root sequence (Ade= *Agaricus devoniensis* BZIP fTF) used to build the dendrogram (Figure 4).

Positions in gDNA sequence (GenBank accession number FJ940724): 9; 21; 30; 48; 57; 117; 123; 139; 219; 249; 270; 303; 321; 354; 380; 384; 429; 432; 447; 474; 477; 583; 611. Intron position: 370 - 423. Ellipses: alleles specific to North American strains. Rectangle boxes: specific alleles to European strains but strain Bs0004 from Canada. This strain or the two *aap1* alleles it contains are probably escaped from culture. * position 139, SNP on the first base of the codon, dividing the population into two groups one with an adenine, the corresponding amino acid being a threonine (T- 47), the other with a guanine, the corresponding a.a. being an alanine (A-47), cf. Figure 4. Haplotype H-4 is present in *eurotetrasporus* and *bisporus* strains. Three haplotypes belong to var. *burnettii*, all other haplotypes belong to var. *bisporus*.

sequences from the DNA coding sequences of the nucleus arranged according to the different *A. bisporus* strains led to four groups of phenotypes for the protein *Aap1* due to the combination of alleles in the various heterokaryotic strains (Table 3). No specific allele was observed for the mycelium surviving at 33°C. Comparison between the protein phenotype and the ability of the strains to produce fruiting bodies at 25°C (FHT⁺) showed that the profile P1 with amino-acids TAE was present in at least one nucleus of 11 out 14 FHT⁺ strains whatever their origin whereas 8 of the 13 FHT⁻ strains have this peptide sequence. Fisher's Exact Test [Fisher 1954] for count data shows that these differences were not

significant. Despite the polymorphism of *aap1* is not clearly correlated with the thermo-tolerance of the strains, the data doesn't close the door to a contribution to the expression of the ability of *A. bisporus* strains to fruit at 25°C.

Table 3. Classification of strains based on their *Aap1* peptide sequences and their thermo-tolerance.

Pairs of peptide sequences	Phenotypes		
	Fructification at 25°C	Mycelium survival at 33°C	Others
1/1	Bs0094, Bs0374, Bs0739	Bs0679, Bs0739	Bs0420
1/2	Bs0190, Bs0419B, Bs0571 Bs0431C, Bs0474, Bs0661		Bs0085A, Bs370, Bs0416D, Bs0261, Bs0026 (=HU1)
1/3	Bs0483		Bs0717
1/4	Bs0738		
2/2	Bs0285, Bs0584, Bs0705	Bs0564	Bs0004, Bs0572, Bs0423, Bs0514

3-4- Expression of *aap1* in thermo-tolerant strains at the fruiting stage

The putative involvement of *aap1* in the thermo-tolerance during the first stage of fruiting was studied by measuring the relative expression levels in primordia produced at 17°C and 25 °C, using a sample of 9 strains selected for their ability to produce mature fruiting bodies at 25°C [Largeteau *et al.* 2011]. The differences were weak but significant for 4 of the strains. A higher expression was recorded in primordia obtained at 25°C than in those obtained at 17°C for Bs0094 and Bs0661 whereas *aap1* was down-regulated for Bs483 and Bs738 (Figure 6). The low levels of regulation and the absence of a general pattern tend to indicate that *028-1* is not involved directly in primordia susceptibility to different temperatures. Previous development stages such as mycelial cords or pinheads should have been more appropriate to unravel a difference in expression of *aap1* at 17 and 25°C.

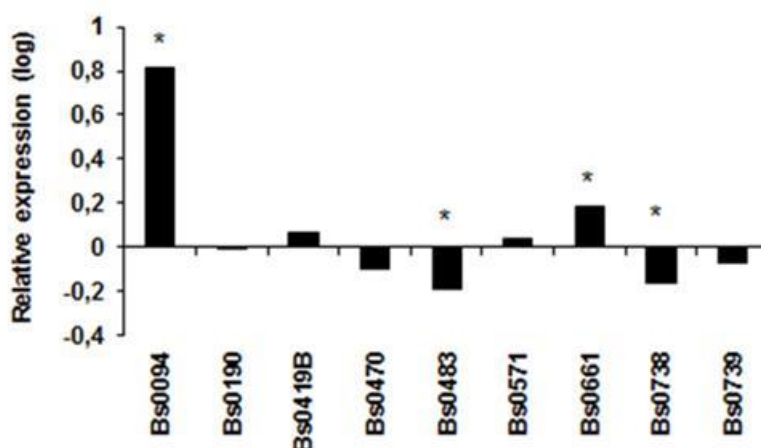


Figure 6. Expression of *aap1* gene in primordia obtained at 25°C relative to expression in primordia obtained at 17°C for 9 strains of *A. bisporus*. Values are log-transformed data of expression ratios after normalization against the housekeeping gene *ef1-α*. Significantly different at * $p < 0.001$.

Temperature may affect the differentiation of primordia to mature fruiting bodies. We frequently observed that for some strains primordia were produced at 25°C, but they never gave rise to fruiting bodies. When the expression of *aap1* was compared in fruiting bodies and primordia obtained at 17°C, only Bs0094 showed a significant over-expression in the fruiting bodies, but at very low level (Figure 7). At 25°C the gene was up-regulated in fruiting bodies for 3 strains whereas it was down-regulated for Bs0094. Such differences between the strains could be linked to the level of adaptation for fruiting at 25°C. Moreover, in absence of significant regulation, differences in basal expression levels in primordia could contribute to the involvement of *aap1* to their ability to develop into fruiting bodies at 25°C. It would be interesting to measure basal levels of expression in a large set of primordia obtained at 17°C from both thermo-tolerant and susceptible strains unable to produce fruiting bodies at 25°C for comparing the two groups.

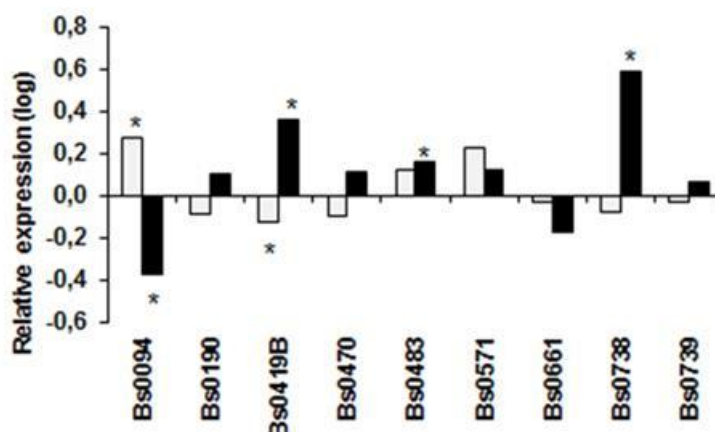


Figure 7. Relative expression of *aap1* gene in fruiting-bodies vs. primordia obtained at 17°C (grey) or at 25°C (black). Values are log-transformed data of expression ratios after normalization against the housekeeping gene *ef1 α*. - Significantly different at * $p < 0.001$.

The low level and low significance of differential regulation between the cultures at 17 and 25°C at the two stages of morphogenesis studied here lead to the conclusion that *aap1* was not directly involved in the ability of *A. bisporus* strains to produce mature fruiting bodies at a higher temperature than that used for the cultivated strains.

3-5- Alternative transcriptional initiation hypothesis

Using a rapid amplification of cDNA ends (RACE), Chen *et al.* [2005] obtained a cDNA sequence that begins at position 810 of *aap1* coding sequence (ccgaTtctt@810) corresponding to the third base of the codon of aspartate D-270. They suggested that the first methionine found by translating cDNA on the three reading frames, could be the beginning of the translation. This methionine is M-313 in the entire protein sequence and then corresponds to the same reading frame as the whole protein. In the *A. bisporus* H97 genome portal [30] many EST of *aap1* gene (protein ID 239429) are indicated before the beginning of the cDNA found by Chen *et al.* [2005] and no EST begins at the same place as that of Chen *et al.* [2005]. However thermic stress was not used when RNAs were obtained and sequenced to annotate the genome. An alternative transcriptional initiation, from nt 810 of the cds, could occur during stress conditions. The resulting protein would lack bZIP region and NLS motif but not NES motif. It could interact in the cytoplasm with exportin binding the NES motif. Chen and co-worker [2009] transformed a non-thermo-tolerant strain with a plasmid vector containing only a partial part of the *aap1* gene: their cDNA (028-1). Differential transcriptional initiation of the same gene depending of the thermic conditions could modulate the phenotype. This hypothesis should be tested.

CONCLUSIONS

This work sets up the first in-depth study aimed to validate the expression of a gene in high temperature fruiting. Unlike the Chinese strain studied by [Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2008], the *028-1* gene did not seem to be involved as a major factor in thermo-tolerance of European and American strains of *A. bisporus* var. *bisporus*. The sequence of the protein encoded by this gene was established and was identified as an activating protein YAP1-like transcription factor (*aap1*). Many Ascomycota and Basidiomycota homologs of *aap1* were found. We demonstrated that the redox sensing mechanism involved in YAP1 transcription factor participating to yeast thermo-tolerance was not entirely conserved in this YAP1 homolog. In fact, cysteine positions involved in disulfide bonds were not conserved. That is the reason why we give a new name, *aap1*, to this gene belonging to a new Agaricomycotina (Basidiomycota) subfamily of YAP1 homologs. *Aap1* might be involved in general stress resistance mechanisms and act not directly and only partially in the ability of *A. bisporus* strains to produce mature fruiting bodies at a higher temperature than that used for the cultivated strains, but it acts indirectly in the vegetative mycelium. Its DNA sequence polymorphism and deduced peptide sequences were not strictly related to the phenotypes but to the varieties and the populations from which the strains were originated. This work highlights the need to study in *A. bisporus* populations the polymorphism of the sequence susceptible to be the promoter of the gene and of the NLS motif in order to conclude about the putative link between this gene, the FHT trait and the mycelium thermo-tolerance. Two other hypotheses should be tested: - are there differences in basal expression levels of the gene, in a large set of strains, at the mycelium or at the primordia stages? - is there a differential transcriptional initiation of the gene depending of the thermic conditions? We also noticed the high variability of the NLS region in *YAP1 transcription factor* and *Aap1* homologs among Dicarya. This variability could play an important role in the unequal ability of these proteins to enter the nucleus to activate the target genes. The recent release of the whole genome sequence of *A. bisporus* [Morin *et al.* 2012] and the publication of an expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* and *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid [Foulongne-Oriol *et al.* 2010] open new opportunities to search for candidate genes through without *a priori* approaches.

Article 4- Differential expression of the gene *hspA* in FHT⁺ strains of *Agaricus bisporus* fruiting at 17°C and 25°C

INTRODUCTION

The white button mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, is the most valuable edible fungus with a commercially important production in many countries. Temperature is an important environmental factor that affects the growth, quality, and yield of *A. bisporus*. This basidiomycete is generally regarded as a fungus that requires a low temperature (<18°C) for the induction and/or production of fruiting bodies, as compared with vegetative growth, which has a temperature optimum of 24 to 25°C. Generally, a temperature over 32°C stops the growth of the mycelium. Some wild strains were shown to be able to produce fruiting bodies at temperatures up to 25°C (Largeteau *et al.* 2011), but knowledge on the molecular investigations of their thermo-tolerance is still limited. We recently studied polymorphism in *028-1* and observed it was variety dependent and partly related to the ability to produce mature fruiting bodies at 25°C, but differential expression experiments were not conclusive (Navarro *et al.* 2013).

Heat shock proteins (HSPs) constitute a large group of chaperone proteins found in virtually all organisms (Scieglinska *et al.* 2011). They are a class of ubiquitous and highly conserved proteins which show increased expression in response to an elevated temperature or other forms of environmental stress including increases in concentrations of reactive oxygen species (ROS) (Duan Y-H *et al.* 2011). HSPs are classified into several families on the basis of their molecular size and amino acid sequence similarity. The level of ROS in the cell regulates the growth and differentiation of the fungal organism, and the adaptation of fungi to oxidative stress is tightly connected with the redox-dependant changes in the activities of antioxidant components. HSPs are known to be induced by oxidative stresses and to protect the cells for ROS damages. The *hspA* gene (GenBank X98508) was identified in *A. bisporus* thanks to differential expressions in primordia and fruiting bodies of a commercial strain (Ospina-Giraldo *et al.* 2000). Expression of this member of the *hsp70* family in strains of *A. bisporus* susceptible and tolerant to a mushroom pathogen, *Lecanicillium fungicola* showed that the tolerant strains displayed a higher level of transcript in the primordia, which are the

stage receptive to the pathogen, suggesting a role in stress resistance (Largeteau *et al.* 2010).

In the present work, expression of *hspA* was measured in vegetative mycelium, primordia and fruiting bodies of different wild strains of *A. bisporus*. The objective was to set whether it is involved in the adaptation to higher temperatures than those commonly used for this mushroom cultivation.

MATERIALS AND METHODS

Of the ten strains of *A. bisporus* we studied, eight were *A. bisporus* var. *bisporus*, and two were *A. bisporus* var. *burnettii*. (Bs0094, Bs0738). They all are wild strains and they had been shown to be able to significantly produce fruiting bodies when cultivated at 25°C (Largeteau *et al.* 2011). They are maintained in the CGAB collection, INRA, France (Table 1).

Table 1. *Agaricus bisporus* strains

Strains	Isolation area	Habitat
Bs0094	USA, Sonoran desert	Mesquite bush
Bs0190	France, West, Lorient	<i>Cupressus macrocarpa</i>
Bs0419B	France, South-west, Capbreton	<i>Cupressus macrocarpa</i>
Bs0470	Russia, Penza	<i>Picea</i>
Bs0483	Canada- Alberta	<i>Picea</i>
Bs0571	Greece- Larissa	Caw manure in field
Bs0661	Greece- Gravia	<i>Cupressus sempevirens</i>
Bs0705	Portugal	Horse paddock
Bs0738	USA, Sonoran desert	Mesquite bush
Bs0739	Mexico- Tlaxcala	<i>Cupressus macrocarpa</i>

Primordia and fruiting-bodies were obtained by cultivation at an experimental scale at 17°C and 25°C, as previously (Navarro and Savoie, 2013). Spawn was prepared on cooked rye grains purchased by Euromycel (France) and cultivation was in 0.09 m² crates filled with 8

Kg of compost purchased by a local mushroom grower (Renaud SA, Pons, France) and spawned at 0.8 %, 4 replications. Incubation was for 13 days at 25°C. After casing and post incubation for 7 days, half of the crates were moved to a fruiting room regulated at 17 ± 2°C and 87-90 % relative humidity; the other half to a fruiting room regulated at 24 ± 2°C and 92-95 % relative humidity. Some primordia and fruiting bodies produced at 17°C or 25 °C were harvested.

The fungal material was placed on ice immediately after harvest and was prepared. The gills of the sporophores were removed for eliminating the gene regulation due to the sporogeneses. The samples were immediately deep frozen into liquid nitrogen before being stored at -80°C until being required for RNA extraction.

The frozen material was ground in liquid nitrogen, and total RNA was extracted with the QIAshredder® kit and the RNeasy® mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's procedure. Residual DNA was removed using the RNase-Free DNase Set (Qiagen). The RNA suspensions were pools of extracts obtained from 25 healthy primordia, or from five sporophores. First-strand cDNA was synthesised from 800 ng total RNA by oligo (dT)15 priming using the first-strand cDNA kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. To check for residual genomic DNA in the RNA suspension, a negative control was performed, applying the same procedure except the addition of M-MLV reverse transcriptase. The primers for the housekeeping gene *EF1-α* (X97204) and the gene heat shock protein *hspA* (GenBank X98508) had been designed previously (Largeteau *et al.* 2010).

Amplification of cDNA was performed in a Light Cycler 2.0 (Roche). The reaction mixture consisted of 5 µl of cDNA, the forward and reverse primer and 4 µl of Master MIX (LC FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I kit, Roche Diagnostics) in a total volume of 20 µl. After a 10-min activation of the hot-start Taq DNA polymerase at 95°C, 35 cycles of 15 s at 95°C, 15 s at 59°C and 20 s at 72°C were performed. Data were acquired at 72°C. A melt curve was run at the end of the 35 cycles to check for a unique PCR reaction product. Negative controls contained either sterile water or the no-reverse transcriptase RT product instead of cDNA. Each reaction was in triplicate. Standard curves were built with serial dilutions of cDNA pools of the different strains from either primordia or fruiting bodies produced at 17°C or 25°C. The LightCycler Software 4.0 (Roche Diagnostic) was used to create Ct values.

Data were analysed by the pair-wise-fixed reallocation randomisation test provided by the software tool REST-384© (Pfaffl 2001; Pfaffl *et al.* 2002). Results are presented as ratios of gene expression according to Eq. 1:

$$R = \frac{(E_{hspA})^{\Delta Ct_{hspA} \text{ (reference sample - test sample)}}}{(E_{EF1-\alpha})^{\Delta Ct_{EF1-\alpha} \text{ (reference sample - test sample)}}$$

RESULTS AND DISCUSSION

The both sets of primers, displayed the same efficiency and generated a unique melting peak of same T_m with serial dilutions of each cDNA pool (primordia and fruiting bodies at 17 and 25°C), which allowed the comparison between the development stage for the expression of the candidate gene.

Previous observations during cultures of various *A. bisporus* strains at 25°C (Largeau *et al.* 2011) showed that some FHT⁻ strains initiated many pinheads or small primordia, but they never pursue their differentiation to sporophores. This developmental stage being apparently critical for the adaptation to the temperature, we focused our studies on it. The comparison of *hspA* expression levels in primordia produced at 17 °C and primordia produced at 25 °C (Figure 1) shows significant lower levels at 25°C than at 17°C for the six strains and no difference for the other four strains. Surprisingly the latter had been all isolated from Cypress litters in different places. The number of tested strains should however be higher for concluding.

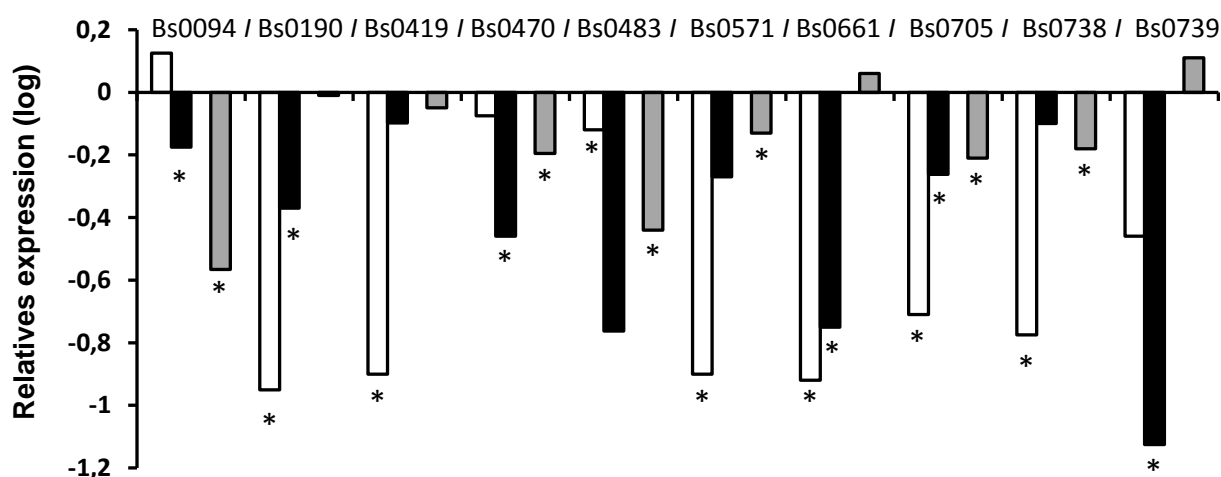


Figure 1. Relative expression of *hspA* in primordia and sporophores of *A. bisporus* FHT⁺ strains produced at 17 and 25°C.

White bars are sporophores vs primordia at 17°C, black bars are sporophores vs primordial at 25°C, grey bars are primordial at 25°C vs primordia at 17°C. * Significantly different from the reference at $p < 0.001$.

Accumulation of heat shock proteins in cells exposed to high temperature has been associated with the acquisition of thermo-tolerance (Lindquist and Craig, 1988). HSPs have been reported as induced by exposure of cells to thermal and other abiotic stressful conditions in fungi (Montero-Barrientos *et al.* 2007, 2008; Miersch and Grancharov, 2008). For instance, *Trichoderma harzianum* T34 hsp70 gene was found to confer thermo-tolerance as well across-tolerance to osmotic, salt and oxidative stresses (Rey *et al.* 2004; Montero-Barrientos *et al.* 2008). It is well known that cells can acquire tolerance to lethal stress by a moderate pre-treatment of the same type of stress. Bacteria possess mechanisms to adapt to sub lethal stresses, rendering them resistant to lethal levels of the same stress (Asadulghani *et al.* 2004). The fact that there was no overexpression of *hspA* in primordia produced at 25°C shows the ability to produce mature sporophores at this temperature is probably not linked to a stress response mechanism. The sample of *A. bisporus* strains studied was heterogeneous and some strains originated from regions where temperatures average exceed regularly 30° (Bs0738 and Bs0094) or can pass under -10°C (Bs0470 and Bs0483), but they all were able to produce sporophores during cultivation at 25°C. The FHT⁺ trait might be a lesser sensitivity or a lack of sensitivity to temperature for the signalling way leading to the sporophore differentiation and morphogenesis. Such conclusions have also been proposed from studies on a transcription factor activated during stress response in fungi (Navarro *et al.*, submitted).

Largeteau *et al.* (2010) observed a regulation of *hspA* with the development stage from the mycelium aggregates to the sporophores. Globally, the regulation level of the gene *hspA* between the two developments stages studied here was more important at 17°C than at 25°C for most of the strains. For eight out ten strains at 17°C, the level of expression of *hspA* at the sporophore stage was significantly lower than at the primordium stage with a factor of regulation equal to 2.9 for the Bs0739 strain and of 5.2 to 8.2 for the other strains (Figure 1). At 25°C, the differential expression level of *hspA* gene was either not significant or with a low factor of lower expression (1.5 to 3.0) in sporophores relative to primordia in 7 strains. In Bs0739, Bs0483 and Bs0661 the factors of down-regulation was higher (6.0 to 14.6). These lower expressions in sprorophores than in primordia is not in agreement with previous data (Largeteau *et al.* 2010) showing 9 fold lower level of expression in primordia than in sporophores for a cultivated white hybrid (Amycel 2100). Measurement of the relative level of expression of the *hspA* gene in primordia produced at 17°C in a set of cultivated hybrids and

sets of both FHT⁺ and FHT⁻ wild strains would be interesting for establishing is the thermo-tolerance is associated with a higher basal level of *hspA* expression in primordia. Such a correlation has been observed for the resistance to the dry bubble disease (Largeteau *et al.* 2010).

For the two strains of *A. bisporus* var *burnettii*, the levels of expression at the two stages were not different at 25°C, as well as at 17°C for Bs0094 but not Bs0738. As previous ones (Navarro *et al.*, submitted; Navarro and Savoie, 2013), this observation tends to signify differences in thermo-tolerance mechanisms in the var. *bisporus* and var. *burnettii*. On another hand, despite the isolation of the population of *A. bisporus* var. *burnettii* in the Sonoran desert, phenotypic variability exist between the isolates.

CONCLUSION

The level of expression of the Heat Shock Protein gene *hspA* varied significantly between the both stages of development, and in primordia between the both temperatures of fruiting in the strains of *A. bisporus* able to produce mature fruiting bodies at 25 °C. However it did not appear to be specifically involved on the reaction chain leading to the differentiation and morphogenesis of sporophores at 25°C. Its relative higher level of expression in primordia, the critical stages, than in sporophores whatever the temperature tends to show that it might contribute to condition the primordia in a physiological state ready to rapidly progress in the differentiation leading to the production of mature sporophores.

Conclusion

Pour obtenir des informations sur les mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans la thermotolérance d'*A. bisporus* et son aptitude à fructifier à 25°C, nous avons développé une approche par gène candidat. Du fait de la pauvreté des données disponibles, mais aussi de difficultés méthodologiques rencontrées, seuls deux gènes ont été étudiés.

Le gène *028-1*, de fonction inconnue et dont la séquence disponible n'était que celle de l'ADNc, a été étudié tant au niveau génomique et polymorphisme de séquence intraspécifique qu'au niveau de la régulation de son expression en lien avec la thermotolérance. Ce gène a été décrit comme étant associé à la thermo-tolérance du mycélium végétatif d'une souche particulière d'*A. bisporus* (Wang *et al.* 2004). Nous avons mesuré les différences de niveau d'expression de *028-1* induites par un passage à 32 °C pendant 12 h de mycélium végétatif cultivé à 25°C. Ces mesures ont été réalisées sur 2 souches d'*A. bisporus* var. *burnettii*, cinq souches de la variété *bisporus* dont trois étaient FHT⁺ et l'hybride naturel var. *bisporus* X var. *eurotetrasporus* (FHT⁻). Les résultats ont montré que les souches FHT⁺ tendaient à répondre au stress lié au traitement thermique sur le mycélium végétatif par une sur-expression significative du gène *028-1*, avec cependant des niveaux assez faibles. Les souches FHT⁻ n'ont au contraire pas réagi. Ainsi ces travaux utilisant différentes souches confirment et complètent ceux de Chen *et al.* (2009) sur une souche transformée avec le *028-1* originel et montrent que l'implication de *028-1* est l'un des facteurs associés avec une thermo-tolérance globale de certaines souches d'*A. bisporus* qui sont capables à la fois de résister aux stress thermiques faibles pendant la phase de croissance végétative et de produire des sporophores matures à 25°C.

Le séquençage du gène complet à partir de l'ADN chromosomique sur un échantillon de souches représentant le quart de celui étudié dans le chapitre 2 nous a permis de préciser les séquences nucléiques (un intron représentant 7,7% du segment a été identifié) et protéiques de ce gène. Elles ont été déposées dans GenBank sous les numéros FJ940724.1 et ACR25139.1, respectivement. Par analogie avec des séquences connues, nous avons pu progresser vers l'identification du rôle supposé du gène. Les domaines conservés se rapprochent d'éléments des facteurs de transcription YAP1 et PAP1 qui sont des facteurs de régulation des réponses aux stress oxydants chez *Saccharomyces cerevisiae* (Rodrigues-Pousada *et al.* 2004; Chen *et al.* 2008). L'annotation de ce gène dans des génomes de basidiomycètes disponibles montre une conservation des domaines dans ses structures.

Sur la base de ces observations, le gène *028-1* d'*A. bisporus* peut être considéré comme un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse au stress oxydatif généré par le choc thermique. Nous l'avons nommé *aap1* pour « *Agaricus bisporus* Activating Protein » puisqu'il est membre de la sous-famille des facteurs de transcriptions semblable à YAP1, présente dans les Agaricomycetes et Dacrymycetes, mais ne formant pas de ponts désulfites de la même façon que YAP1p en environnement oxydant.

Le gène *aap1* a été aisément identifié dans toutes les souches d'*A. bisporus* étudiées quelles que soit la variété et leur thermo-tolérance. Dans les segments de gène de 700 à 800 paires de bases analysés sur 24 souches d'*A. bisporus* issues de l'échantillon étudié dans le chapitre 2, 12 haplotypes nucléaires avec 40 sites polymorphes ont été identifiés. Ceci montre le niveau assez élevé de polymorphisme de ce gène. Le polymorphisme de deux positions permettait de distinguer *A. bisporus* var. *burnettii* des deux autres variétés. De plus des haplotypes sont spécifiques des souches européennes. Un des haplotypes abondant présentait une distorsion de distribution dans les souches FHT⁺ et FHT⁻, soulignant la contribution possible de certains allèles du gène *028-1* à la régulation de la fructification par la température. La majorité des substitutions de nucléotides étaient silencieuses, mais une région variable de 9 nucléotides dans une région codante a permis d'identifier 4 séquences protéiques. La combinaison des allèles dans les souches hétérocaryotiques a permis de définir qu'une séquence peptidique de cette région variable était plus fréquemment présente chez les souches FHT⁺ que les souches FHT⁻. Cependant le facteur de significativité était assez faible ($p=0,097$). Une telle observation peut être associée à une origine phylogénétique commune, mais ne permet pas de conclure quant au rôle de ce polymorphisme sur le caractère FHT⁺.

L'implication potentielle de *028-1* dans le caractère FHT⁺ a été testée par mesures des niveaux relatifs d'expression dans les primordia produits à 17 et à 25 °C. Les faibles différences de niveaux d'expression entre les deux températures et l'absence de schéma général d'évolution tendent à montrer que le gène n'est pas impliqué directement. Le stade primordia est pourtant apparu comme étant critique pour le caractère FHT⁺. Des souches FHT⁻ produisent de petits primordia qui ne se développent jamais. La comparaison des stades sporophores et primordia à 17° et 25 °C ne permet pas non plus de conclure. Par contre, lorsque les souches sont comparées en fixant arbitrairement la valeur 1 pour une des souches, une corrélation négative significative a été observée entre le niveau relatif d'expression du gène et le rendement : les souches à plus haut rendement étaient celles qui avaient les plus faibles niveaux d'expression de *028-1* dans les primordia, à 17 °C. Nous concluons donc qu'*aap1* n'est pas impliqué directement dans l'aptitude à produire des

sporophores à des températures plus élevées que celles utilisées pour les souches cultivées, mais il peut intervenir indirectement au stade du mycélium végétatif soumis à des températures élevées.

Le second gène candidat dont les niveaux relatifs d'expression ont été étudiés est le gène d'une protéine de choc thermique, *hspA*. Ces protéines sont associées aux mécanismes de résistance aux stress divers qui se traduisent souvent dans les cellules par un choc oxydant. Le gène était significativement plus fortement exprimé dans les primordia que dans les sporophores aux deux températures. Au stade primordia, les niveaux d'expression étaient plus importants à 17°C qu'à 25°C, semblant indiquer que le stress est ici associé à la baisse de température. Ainsi *hspA* ne semble pas spécifiquement impliqué dans la chaîne de réaction conduisant à la différenciation et la morphogénèse des sporophores à 25°C. Par contre il semble contribuer globalement à conditionner les primordia dans un état physiologique prêt à évoluer rapidement dans la différenciation conduisant à production de sporophores matures.

L'approche gène candidat développée dans ce chapitre a fourni quelques informations indirectes sur la thermo-tolérance de souches sauvages d'*A. bisporus*, mais les gènes étudiés n'étaient pas des gènes majeurs du déterminisme génétique de ce caractère complexe qui doit probablement impliquer de nombreuses régulations génétiques à effets cumulatifs. Des approches sans *a priori* doivent donc être envisagées. Parmi ces approches, l'identification de loci liés à des caractères quantitatifs peut être intéressante car elle permet aussi de développer des outils de sélection assistée par marqueurs. Pour cela il est d'abord nécessaire de connaître le déterminisme génétique du caractère FHT⁺. C'est l'objet du chapitre 4.

CHAPITRE 4

Chapitre 4

Héritabilité de l'aptitude à fructifier à 25°C chez le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*)

INTRODUCTION

L'analyse du caractère fructification à haute température (FHT⁺) à 25°C des souches sauvages réalisée précédemment a montré que le caractère FHT⁺ semble être un caractère fixé dans la variété *burnettii*. Afin d'envisager la sélection de souches améliorées pour leur aptitude à fructifier à haute température en exploitant le caractère FHT⁺ de la variété *burnettii*, il est tout d'abord nécessaire d'en connaître le déterminisme génétique, c'est-à-dire l'hérédité du caractère. Pour cela, nous avons étudié la ségrégation du caractère FHT⁺ apporté par la variété *burnettii* dans une descendance inter-variétale *bisporus* x *burnettii*. Cette descendance constitue un modèle d'étude au laboratoire pour la génétique et a notamment été déjà utilisé pour étudier la résistance aux maladies (Foulongne *et al.* 2012a) et certains caractères agronomiques (Foulongne *et al.* 2012b). Des avancées en cours pour l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs sont discutées.

MATERIALES ET METHODES

Souches fongiques et descendants. La descendance utilisée est constituée de 89 hybrides de seconde génération [(Bs26-7 x Bs94-83)_i x Bs26-2] (Callac *et al.* 1998, Imbernon *et al.* 1996). Les souches Bs26, Bs094 et l'hybride de première génération H (Bs26-7 X Bs94-83) sont utilisées comme témoins.

Schéma expérimental et conditions de culture. Toutes les souches ont été testées pour fructifier dans des conditions commerciales. Un substrat de 600 g de compost préparé commercialement par un cultivateur de champignons (Renaud SA, Pons, France), a été utilisé pour leur production. Pour les essais de fructification, 4 répétitions d'unité de culture de 600 g de compost (barquettes) ont été préparées en mélangeant le mycélium correspondant (directement des boîtes de Pétri) avec le substrat (compost). Après, les barquettes ont été incubées à 25°C dans l'obscurité jusqu'à la propagation du mycélium dans tout le substrat (approximativement 3 semaines).

Quand les barquettes ont été colonisées, on a ajouté la terre de couverture (gobetage) et elles ont été incubées encore à 25°C pendant une semaine. Après, elles ont été transférées sous conditions de fructification (95% humidité) et incubées soit à 17°C (condition normale témoin), soit à 25°C (condition FHT) (deux barquettes par souche et par température). Trois répétitions d'essais ont été réalisées (Essais 1, 2 et 3).

Caractères étudiés (Tableau 1). La période de récolte a eu une durée de 45 jours. Les corps fructifères matures ont été dénombrés, collectés et pesés (nombre sporophores : Nb ; Poids : P) quotidiennement pendant cette période. Le jour correspondant au premier corps fructifère récolté (précocité) a été enregistré. La précocité est définie comme le temps exprimé en jours, depuis lequel on a mis la terre de gobetage jusqu'à la première récolte. La couleur des sporophores évaluée visuellement (brun ou blanc) pour chaque souche a été notée.

Analyse statistique. L'effet du génotype sur chaque caractère a été déterminé par une analyse de variance (ANOVA) selon le modèle statistique :

$$Y = \mu + G + \varepsilon$$

où Y est la valeur observée pour le caractère étudié, μ est la moyenne, G est l'effet génotype, et ε est l'erreur du modèle.

Estimation de l'héritabilité. L'héritabilité au sens large a été estimée selon la formule suivante:

$$H^2 = \frac{Var(G)}{Var(P)}$$

où Var (G) est la variance génotypique, et Var (P) la variance phénotypique. Pour calculer les héritabilités nous avons utilisé les formules suivantes :

$VarG = (MSg - MSe)/2$, $VarE = MSe/2$, où MSg est la moyenne des carrés du modèle, et MSe la moyenne des carrés de l'erreur.

Les corrélations intra et inter essais ont été calculées par l'intermédiaire du coefficient de corrélation de Pearson.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 2008.

Table 1. Descriptif des caractères étudiés dans la descendance

Caractère	Définition	Désignation	Essai
Précocité	Temps (en jours) depuis l'initiation de l'incubation dans les conditions de fructification jusqu'à la récolte du premier corps fructifère.	J 17°C et J 25°C	1 et 3 = 25°C 2 = 17 et 25°C
Poids	Poids de corps fructifères récoltés durant le temps de récolte.	P 17°C et P 25°C	2 = 17 et 25°C 3 = 25°C
Nombre de corps fructifères	Nombre de corps fructifères récoltés durant le temps de récolte.	Nb 17°C et Nb 25°C	1, 2 = 17°C 1, 2 et 3 = 25°C
Couleur	La couleur a été enregistré e comme : souches blanches et souches brunes.	Blanc ou brune	1,2 et 3 = 17°C et 25°C

RESULTATS ET DISCUSSION

Sur la Figure 1, nous pouvons observer la distribution des génotypes de la descendance étudiée pour leur production de sporophores à 25°C. Les hybrides étudiés peuvent fructifier à 25°C ce qui démontre que la capacité à fructifier à 25°C est un caractère héritable pour le parent Bs094 (*A. bisporus* var. *burnettii*). Le caractère FHT⁺ évalué à travers le nombre de sporophores produits à 25°C montre une distribution continue au sein de la descendance étudiée ce qui laisse supposer un déterminisme polygénique. Les hybrides présentent des valeurs intermédiaires pour le nombre de champignons obtenus à 25°C par rapport aux parents. Les valeurs de production obtenues pour les deux parents (0.5 pour Bs026, 17.5 pour Bs094) sont comparables à ceux obtenus par Largeteau *et al.* (2011) (0 pour Bs026, 24.5 pour Bs094).

Les hybrides présentent un comportement légèrement différent selon les essais. On observe respectivement 80%, 66% et 50% des hybrides ayant fructifiés à 25°C dans chacun des 3 essais. Les hybrides FHT+ ont produit en moyenne, 8, 7.3, et 6.9 corps fructifères respectivement pour les essais 1, 2 et 3. Les corrélations inter-essais sont hautement significatives pour l'ensemble des caractères étudiés, à l'exception de la précocité à 25°C (Tableau 2). Considérant la variable Nb de sporophores à 25°C, les essais 2 et 3 sont les mieux corrélés entre eux. Les différences observées peuvent être dues à des variations de température dans la chambre de production. Malgré cela, ces résultats illustrent la répétabilité des données et confirment l'efficacité de notre dispositif pour évaluer le caractère FHT.

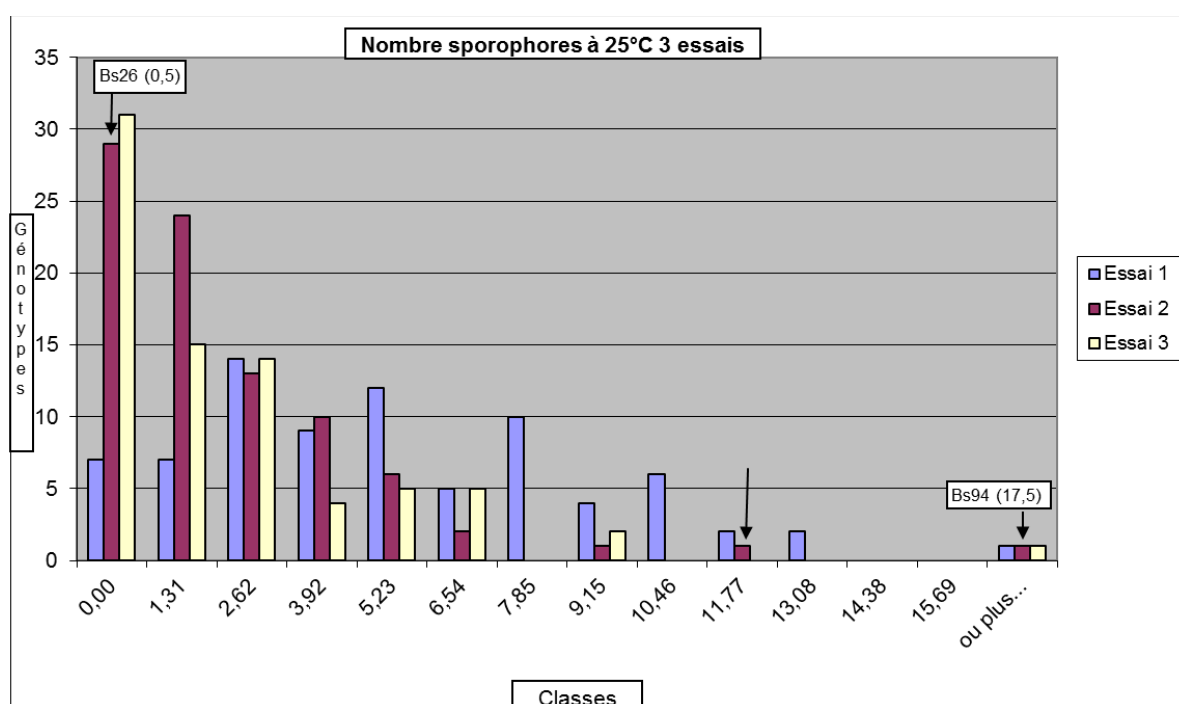


Figure 1 Distribution des génotypes de la descendance d'*A.bisporus* var. *bisporus* X *A. bisporus* var. *burnettii* pour leur production de sporophores à 25°C. Les valeurs moyennes de données des parents sont aussi indiquées.

L'analyse des corrélations entre caractères permet de mettre en évidence certaines relations. Le nombre de sporophores est fortement corrélé positivement avec le poids, que ce soit à 17°C ou à 25°C. Ceci est en contradiction avec ce qui avait été observé lors de précédentes études (Foulongne-Oriol *et al.* 2012b) et pourrait s'expliquer par l'utilisation d'une échelle de culture différente dans nos essais (petites barquettes de 600g de compost

au lieu de paniers de 9 kg de compost). L'utilisation de petites barquettes limiteraient l'expression de la productivité. On observe que la production de sporophores (en nombre ou en poids) à 25°C est significativement liée à la production à 17°C, suggérant que le fitness des souches conditionne leur capacité à produire à haute température.

Concernant la précocité, nos résultats contradictoires (corrélation significative entre J17 et J25 dans l'essai 1 et non significative dans l'essai 2) ne nous permettent pas de conclure.

Table 2. Coefficients de corrélation de la combinaison des trois essais appliqués. Ils ont été calculés sur trois variables à deux températures prises deux à deux. J= jours (précocité), N= Nombre de sporophores, P= Poids des sporophores. * = significatif au seuil de 5%

	Nb17	Nb25	P25	J17	J25
Essai1/Essai2	0.57 *	0.38*	nd	0.25*	0.26 ns
Essai1/Essai3	nd	0.38*	nd	nd	0.11 ns
Essai2/Essai3	nd	0.6*	0.61*	nd	0.1 ns

Table 3. Coefficients de corrélation des trois essais appliqués. Ils ont été calculés sur trois variables à deux températures prises deux à deux. J= jours (précocité), Nb= Nombre de sporophores, P= Poids des sporophores. * = significatif au seuil de 5%

Essai 1					
	Nb17°C	J25°C	J17°C		
Nb25°C	0.29 *	-0.43 *	-0.20 ns		
Nb17°C		-0.36 *	-0.62 *		
J25°C			0.28 *		
Essai 2					
	J25°C	Nb25°C	Nb17°C	P17°C	P25°C
J17°C	0.09 ns	-0.17 ns	-0.52*	-0.66*	-0.19 ns
J25°C		-0.38*	-0.11 ns	-0.05ns	-0.45*
Nb25°C			0.36*	0.32*	0.88*
Nb17°C				0.88*	0.38*
P17°C					0.30*
Essai 3					
	Nb25°C	P25°C			
J25°C	-0.17 ns	-0.07ns			
Nb25°C		0.86*			

Les analyses de variance démontrent un effet génétique très fort pour la plupart des caractères étudiés dans les essais 1 et 2. Dans l'essai 3, l'effet génétique est non significatif, quel que soit la variable étudiée et on observe un effet répétition très fort (données non

montrées). Ceci est confirmé par les héritabilités très faibles identifiées pour Nb25 P25 et J25 dans l'essai 3. Les valeurs d'héritabilités pour les autres variables dans les autres essais sont élevées et expriment la part de variation phénotypique observée expliquée par la variation génétique.

Table 4. Analyses de variance des trois caractères à deux températures et l'héritabilité.

	Source	DF	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F	h ²
Nb25°C (1)	Modèle	78	2087,80	26,8	3,7	< 0,0001	0,6
	Erreur	79	570,00	7,2			
	Total corrigé	157	2657,80				
Nb25°C (2)	Modèle	82	480,40	5,9	3,0	< 0,0001	0,5
	Erreur	83	160,50	1,9			
	Total corrigé	165	640,90				
Nb25°C (3)	Modèle	74	1111,73	15,0	1,1	0,310	0,06
	Erreur	58	768,00	13,2			
	Total corrigé	132	1879,73				
Nb17°C (1)	Modèle	78	10276,42	131,7	4,3	< 0,0001	0,6
	Erreur	79	2400,50	30,4			
	Total corrigé	157	12676,92				
Nb17°C (2)	Modèle	82	4141,3	50,5	2,8	< 0,0001	0,5
	Erreur	83	1501,5	18,1			
	Total corrigé	165	5642,8				
P25°C (2)	Modèle	82	138557,5	1689,7	4,3	< 0,0001	0,6
	Erreur	83	32869,0	396,0			
	Total corrigé	165	171426,5				
P25°C (3)	Modèle	73	53486,7	732,7	1,5	0,053	0,2
	Erreur	55	26541,0	482,6			
	Total corrigé	128	80027,7				
P17°C (1)	Modèle	82	155028,8	1890,6	2,4	< 0,0001	0,4
	Erreur	83	64929,5	782,3			
	Total corrigé	165	219958,3				
J25°C (1)	Modèle	71	11048,8	155,6	5,3	< 0,0001	0,7
	Erreur	72	2107,0	29,3			
	Total corrigé	143	13155,8				
J25°C (2)	Modèle	53	8842,5	166,8	3,2	0,000	0,5
	Erreur	34	1780,5	52,4			
	Total corrigé	87	10623,0				
J25°C (3)	Modèle	43	1122,9	26,1	1,9	0,151	0,3
	Erreur	9	123,0	13,7			
	Total corrigé	52	1245,9				
J17°C (1)	Modèle	76	6250,0	82,2	6,7	< 0,0001	0,7
	Erreur	77	951,5	12,4			
	Total corrigé	153	7201,5				
J17°C (2)	Modèle	80	4806,1	60,1	2,2	0,000	0,4
	Erreur	73	1987,5	27,2			
	Total corrigé	153	6793,6				

Conclusions

Une efficacité optimale de la sélection ne sera atteinte qu'au travers de la compréhension précise du contrôle génétique de la fructification à température élevée. Dans ce contexte, ce travail a contribué à une meilleure compréhension de l'architecture génétique de l'aptitude à fructifier à haute température. Nous avons montré que le caractère FHT⁺, mesuré à travers le nombre et le poids de sporophores matures produits était sous contrôle génétique complexe. La sélection est donc envisageable. Cependant ce caractère est également fortement influencé par l'environnement.

Notre étude ne nous permet pas de définir le nombre de gènes impliqués, leurs effets et leur localisation sur le génome. Pour cela, à partir des données récoltées, une analyse QTL a été réalisée par ailleurs (Figure 2.).

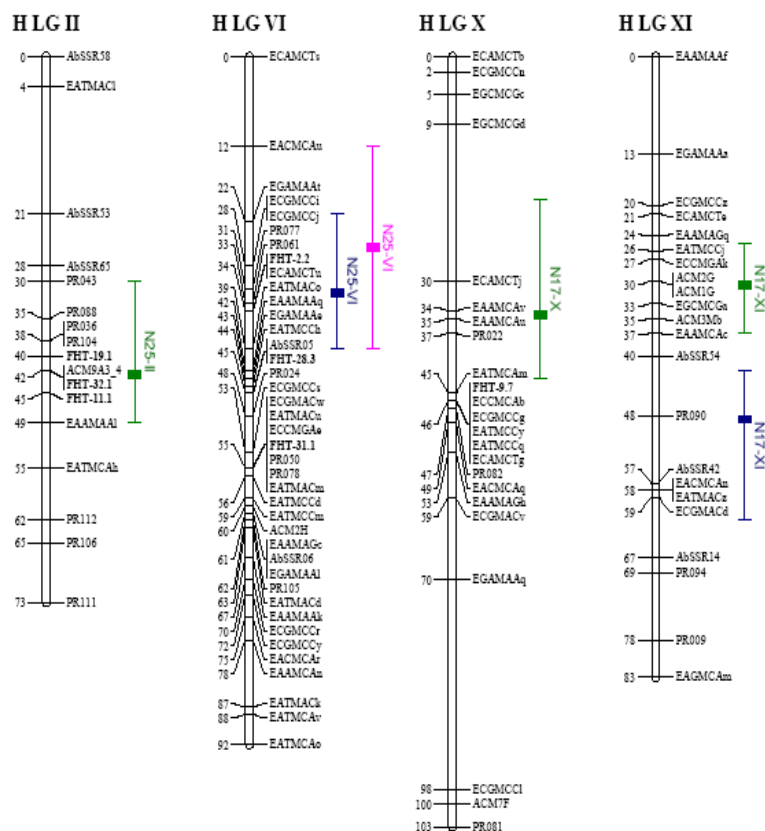


Figure 2. Position des QTLs détectés pour le caractère nombre de sporophores à 25°C (N25) et à 17°C (N17), pour les 3 essais (1 en vert, 2 en bleu, 3 en rose).

Deux locus principaux ont été mis en évidence comme étant impliqués dans le nombre de sporophores produits à 25°C, sur les groupes de liaisons II et VI. Les deux gènes candidats étudiés au cours de la thèse (*028-1=PR107 LG I* et *Hsp=PR108 LG III*, voir Foulongne-Oriol *et al.* 2010) ne co localisent pas avec les QTL détectés. Cela confirme le fait que ce ne sont pas de bons candidats pour comprendre le caractère FHT⁺. Cependant, deux gènes candidats fonctionnels mis récemment en évidence pour leur implication dans la thermotolérance du mycélium (Lu *et al* 2014) chez *A. bisporus* ont été localisés à proximité du QTL sur le groupe de liaison II. Il s'agit d'une 'para-aminobenzoic acid (PABA) synthase' qui agirait par réduction des dommages oxydatifs communément associés au stress

thermique à travers une stimulation de l'expression de protéines de défenses comme les chitinases, et d'une autre HSP70.

Une analyse d'expression différentielle par cDNA-AFLP a été réalisée par ailleurs au laboratoire et pour trouver de nouveaux candidats potentiels (Foulongne-Oriol *et al.*, soumis).

Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs (SAM) pour la fructification à température élevée. La connaissance précise des gènes et des sites impliqués dans le déterminisme génétique de ce caractère (FHT⁺) devrait permettre aux sélectionneurs de contrôler exactement la diversité génétique des variétés améliorées. La SAM offre des bénéfices multiples : possibilité de sélection plus rapide des allèles favorables et gestion précise de la diversité génétique disponible au sein des variétés améliorées.

CONCLUSIONS GENERALES

Conclusions générales

Agaricus bisporus (Lange) Imbach., est le champignon comestible le plus apprécié et le plus consommé au Mexique et dans le monde entier. Cependant au Mexique, sa production à moyenne et à plus grande échelle reste limitée à de grandes entreprises nationales et transnationales. Nonobstant, il y a de petits producteurs intéressés par sa culture. Un des problèmes auxquels sont confrontés ces derniers, est le coût élevé de sa production. Ce coût est lié à l'investissement nécessaire pour contrôler la température pendant la culture, du fait du climat chaud dans une très grande zone de la République Mexicaine durant de nombreux mois de l'année. Le mycélium végétatif de ce champignon se développe à une température optimale de 25°C, mais sa croissance est inhibée aux températures supérieures à 28°C dans les substrats de culture. Ce mycélium est capable de fructifier, dans les cultures actuelles avec les souches commerciales utilisées, dans des salles de culture à une température de 16° - 18° C.

Ma recherche a été focalisée sur l'étude de la variabilité génétique et les mécanismes associés à une adaptation d'*A. bisporus* à la culture dans des conditions subtropicales. L'étude a pour finalité l'obtention d'une souche capable de fructifier dans les conditions ambiantes qui priment au Mexique. Pour cela l'aptitude à fructifier à haute température (FHT⁺) a été étudiée en identifiant ce caractère dans un large échantillon de souches sauvages et en cherchant à définir son déterminisme génique et génétique. La température de 25°C a été sélectionnée pour identifier les souches FHT⁺ dans une collection de souches sauvages collectées dans plusieurs localités des pays d'Amérique du Nord et d'Europe, incluant de représentants des trois variétés d'*Agaricus* à savoir : les variétés *bisporus*, *burnettii* et *eurotetrasporus*.

Aucune des 2 souches d'*A. bisporus* var *eurotetrasporus* caractérisées par leur cycle homothallique n'a fructifié à 25°C. Seules quelques souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ont révélé un potentiel pour fructifier à 25°C, mais avec des rendements qui sont généralement significativement plus faibles qu'à 17°C.. Cette capacité ne paraît être en corrélation ni avec le climat ou microclimat, ni avec l'habitat de la zone de collecte des souches, bien qu'elle soit plus fréquente dans les populations Nord-américaines que dans les européennes. Nous avons cependant noté que dans des conditions standards de culture à 17°C les souches

avec le caractère FHT⁺ ont produit des rendements supérieurs à celui des souches FHT⁻. Le caractère FHT⁺ semble être associé à une fitness générale des souches.

Le caractère FHT⁺ est distribué différemment dans les 3 variétés. Toutes les souches étudiées d'*A. bisporus* var *burnettii* sont capables de produire des sporophores à 25°C, et avec des rendements du même ordre de grandeur que ceux obtenus à 17°C. Des fructifications ont même été obtenues à des températures supérieures, autour de 30°C. Cette variété qui correspond à une population spécifique originaire du désert du Sonoran (Californie) se caractérise par ailleurs par un développement rapide de ses sporophores qui sont petits et produits en grande quantité. Elle possède aussi un cycle de vie principalement hétérotallique. L'ensemble de ces propriétés permet à cette variété de compléter son cycle de vie durant des périodes humides courtes et rares, quelle que soit la température. Ces observations montrent que le caractère FHT⁺ peut être le résultat d'une absence de régulation de la température pour fructifier ou que cette variété tolère de larges intervalles de température pour développer le sporophore. Cette adaptation est propre à la variété *burnettii*. Le polymorphisme de deux positions dans la séquence du gène de thermotolérance étudié permettait par exemple de distinguer *A. bisporus* var. *burnettii* des deux autres variétés.

Dans un croisement intervariétal, le caractère FHT⁺ est héritable à partir de la variété *burnettii*. Lorsque le paramètre mesuré est le rendement à 25°C, le caractère est quantitatif et probablement sous un contrôle polygénique, et il est apparu comme indépendant du rendement à 17°C.

L'espèce *A. bisporus* a une ample plasticité phénotypique et génétique qui est une solution potentielle à des problèmes posés par la fluctuation environnementale (régions tropicales et tempérées d'Amérique et d'Europe). Vraisemblablement, *A. bisporus* var. *burnettii* a développé une tolérance croisée dans le désert de Sonoran, ce qui a fait qu'elle peut fructifier sans avoir besoin de régulation par la température et donc produire des sporophores à température élevée.

Pour approcher les mécanismes de régulation de la fructification par la température, nous avons étudié deux gènes candidats. L'un est le gène de thermotolérance *028-1* pour lequel l'étude approfondie de la structure, des homologues, du polymorphisme dans *A. bisporus* nous a permis de le re-décrire *aap1*, un homologue de *YAP1* de levure. C'est un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif résultant de chocs thermiques.

Les mesures de niveaux d'expression dans les promordia et les sporophores montrent qu'il n'est pas un contributeur dominant pour la thermo-tolérance d'*A. bisporus*, mais la protéine qu'il code peut être impliquée comme facteur de transcription de résistance générale au stress.

Le second gène, *hspA*, bien que correspondant à une protéine de choc thermique n'est pas non plus impliqué significativement dans le processus permettant la fructification à 25°C. Il contribue cependant à conditionner les primordia dans un état physiologique les préparant à évoluer rapidement vers la différenciation conduisant à la production de sporophores matures, mais ceci quelle que soit la température.

Au-delà de la variabilité génétique et phénotypique, nous avons montré que le caractère FHT⁺ est contrôlé par un déterminisme génétique complexe. Il peut potentiellement être exploité dans un programme de sélection variétale pour obtenir des souches d'*A. bisporus* adaptées à la culture en conditions subtropicales et présentant des caractéristiques de rendement et de qualité acceptables par les producteurs et les marchés.

Principales conclusions

- ✓ La variété *Agaricus bisporus* var. *burnettii* a un caractère FHT⁺ qui la caractérise. Elle est bien adaptée pour fructifier dans une large gamme de températures.
- ✓ Quelques souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ont un bon potentiel pour fructifier à 25°C.
- ✓ Les phénotypes FHT⁺ ou FHT⁻ peuvent coexister dans les populations d'*A. bisporus*.
- ✓ La capacité à fructifier à température élevée est plus fréquente dans les populations Nord-américaines que dans les européennes et ne paraît être en corrélation ni avec le climat ou microclimat, ni avec l'habitat.
- ✓ Les souches avec le caractère FHT⁺ produisent des rendements supérieurs à celui des souches FHT⁻ dans des conditions standards de culture à 17°C. Elles ont un meilleur fitness.
- ✓ Tous les allèles du gène *aap1* de 27 souches sont groupés dans le dendrogramme en deux branches avec 2/3 des allèles portés par les souches capables de produire de corps fructifères à 25°C dans l'une d'elles.
- ✓ Une séquence particulière d'acides aminés est présente dans la majorité des souches FHT⁺.
- ✓ Les gènes étudiés choisis d'après la littérature n'étaient que légèrement impliqués dans la réaction au stress de chaleur.
- ✓ Le caractère FHT⁺ est héritable à partir de la variété *burnettii*, indépendamment de l'aptitude au rendement à la température optimale de fructification de l'espèce.
- ✓ Les hybrides de seconde génération sont intermédiaires entre les parents.
- ✓ *Agaricus bisporus* a une ample plasticité phénotypique et génétique qui est une solution potentielle à des problèmes posés par la fluctuation environnementale (régions tropicales et tempérées d'Amérique et d'Europe).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- AGRAWAL AA, LAFORSCH C, TOLLRIAN R, 1999. Transgenerational induction of defenses in plants and animals. *Nature* 401: 60–63.
- ALEXOPOULOS CJ, MIMS CW, BLACKWELL M, 1996. Introductory Mycology (4th Ed.). John Wiley and Sons, New York, USA. 868p.
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 17: 3389–3402.
- ANISIMOVA M, GASCUEL O, 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol*. 55: 539-52. (PubMed).
- ARGUELLES JC, 1997. Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 146:65-71.
- ARGUELLES JC, 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol*. 174: 217-224.
- ASADULGHANI, NITTA K, KANEKO Y, KOJIMA K, FUKUZAWA H, KOSAKA H, NAKAMOTO H, 2004. Comparative analysis of the *hspA* mutant and wild-type *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under salt stress: evaluation of the role of *hspA* in salt-stress management. *Arch Microbiol* 182: 487–497.
- ASCHAN K, 1954. The production of fruit bodies in *Collybia velutipes*. I. Influence of different culture conditions. *Physiol. Plant*. 7: 571-591.
- AZEVEDO D, NASCIMENTO L, LABARRE J, TOLEDANO MB, RODRIGUES-POUSADA C, 2007. The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *Febs Letters*, 581:187-195.
- BEETZ A, KUSTUDIA M, 2004. Mushroom cultivation and marketing. Horticulture production guide. ATTRA (www.attra.ncat.org).
- BELDADE P, MATEUS ARA, KELLER RA, 2011. Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. *Molecular Ecology* 20: 1347–1363.
- BELOZERSKAYA TA, GESSLER NN, 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defence in fungi: a review. *Appl Biochem Microbiol* 43: 506-515.
- BENNETT AF, LENSKE RE, 1997. Phenotypic and evolutionary adaptation of a model bacterial system to stressful thermal environments. *EXS*. 83:135–154.
- BEREZOVSKY IN, SHAKHNOVICH EI, 2005. Physics and evolution of thermophilic adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12742–12747.

- BILLETTE, C, GIBARD T, FOULONGNE-ORIOLE M, SAVOIE JM, 2011. Origin of laccase gene structural diversity in edible mushrooms. 7th International conference on mushroom biology and mushroom products (ICMBMP7), Arcachon, France.
- BINDER, M, HIBBETT DS, LARSSON KH, LARSSON E, LANGER E, LANGER G, 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematics and Biodiversity*, 3:113-157.
- BOIS PR, O'HARA BP, NIETLISPACH D, KIRKPATRICK J, IZARD T, 2006. The vinculin binding sites of talin and alpha-actinin are sufficient to activate vinculin. *J. Biol. Chem.* 281: 7228–7236.
- BOWERS MC, 1994. *Environmental effects of cold on plants*. In: Plant-Environment Interactions. Ed Wilkinson R.E., Marcel Dekker, Inc: 391-411.
- BRADSHAW AD, 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv. Genet.* 13: 115–155.
- BROOKES AJ, 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-86.
- BRUMFIELD RT, BEERLI P, NICKERSON DA, EDWARDS SV, 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18: 249-256.
- BURKE JJ, 2001. Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. *Physiologia Plantarum* 112: 167–170.
- BURTON KS, SREENIVASAPRASAD S, RAMA T, EVERED CE, MCGARRY A, 1995. Mushroom quality and senescence. *Mushroom Science* 14: 687-693.
- CALLAC P, 1994. Prospections pour la recherche d'*Agaricus bisporus* en France: contexte historique et scientifique, premiers résultats. *Bull. Soc. Mycol. France* 110: 145-165.
- CALLAC P, THEOCHARI I, KERRIGAN RW, 2002. The germplasm of *Agaricus bisporus*: main results after ten years of collection in France, in Greece, and in North America. *Acta Horticulturae* 579: 49-55
- CALLAC P, BILLETTE C, IMBERNON M, KERRIGAN RW, 1993. Morphological, genetic, and interfertility analyses reveal a novel, tetrasporic variety of *Agaricus bisporus* from the Sonoran desert of California. *Mycologia* 85: 835-851

- CALLAC P, DESMERGER C, KERRIGAN R W, IMBERNON M, 1997. Conservation of genetic linkage with map expansion in distantly related crosses of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 146: 235-240.
- CALLAC P, HOCQUART S, IMBERNON M, DESMERGER C, OLIVIER JM, 1998. Bsn-t alleles from French field strains of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2105-2110
- CALLAC P, JACOBÉ DE HAUT I, IMBERNON M, GUINBERTEAU J, DESMERGER C, THEOCHARI I, 2003. A novel homothallic variety in *Agaricus bisporus* comprises rare tetrasporic isolates from Europe. *Mycologia* 95: 222-231
- CAPISTRAN-LICEA VM, MILLAN-PACHECO C, PASTOR N, 2009. Thermal adaptation strategies used by TBP *Biophys. J.* 96: 331a.
- CASTRESANA J, 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540-52. (PubMed).
- CHAMBERS JW, CLEVELAND WS, KLEINER B, TUKEY PA, 1983. Graphical methods for data analysis. Wadsworth and Brooks/Cole Publishing Co, Pacific Grove, CA.
- CHANG ST, 1999. *World production of cultivated edible and medicinal mushrooms* in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. *Int. J. Med. Mushrooms* 1: 291-300.
- CHANG ST, MILES PG, 2004. *Mushrooms: Cultivation, nutrition value, medicinal effect, and environmental impact*. 2nd Edition. CRC Press, Florida. pp. 255-256.
- CHEN P, SHAKHNOVICH EI, 2010. Thermal Adaptation of Viruses and Bacteria. *Biophysical Journal* 98 :1109–1118.
- CHEN R, CHEN LF, SONG SY, 2003. Identification of thermo-tolerance related genes in *A. bisporus* (Chinese). *Food Technol. Biotechnol.* 41: 339-344.
- CHEN MY, WANG ZS, LIAO JH, LU ZD, GUO ZG, LI HG, 2005. Full-length cDNA sequence of a gene related to the thermo-tolerance of *Agaricus bisporus*. *Acta Edulis Fungi.* 12: 85- 88.
- CHEN M, WANG Z, LIAO J, LU Z, GUO Z, LI H, 2007. Full-length cDNA sequence of a gene related to the thermotolerance of *Agaricus bisporus*. Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Shanghai, China.

- CHEN DR, WILKINSON CRM, WATT S, PENKETT CJ, TOONE WM, JONES, BAHLER J, 2008. Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 19: 308-317.
- CHEN MY, WANG Z, LIAO JH, LU ZD, GUO ZG, LI HG, 2008. Cloning and sequencing of gene *028-1* related to the thermo-tolerance of *Agaricus bisporus*, in Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, M. van Gruening, Editor, South African Mushroom Farmers Association: Pretoria. p. 159-165.
- CHEN MY, LIAO JH, GUO ZJ, LI HR, LU ZH, CAI DF, WANG ZS, 2009. The expression vector construction and transformation of thermo-tolerance-related gene of *Agaricus bisporus*. *Mycosystema* 28: 797-801 (en chinois).
- CHEVENET F, BRUN C, BAÑULS AL, JACQ B, CHISTEN R, 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*. 7: 439. (PubMed).
- CHOI I-Y, HYTEN DL, MATUKUMALLI LK, SONG Q, CHAKY JM, QUIGLEY CV, CHASE K, GORDON LARK K, REITER RS, YOON M-S, HWANG E-Y, YI S-I, YOUNG ND, SHOEMAKER RC, VAN TASSELL CP, SPECHT JE, CREGAN PB, 2007. A Soybean Transcript Map: Gene Distribution, Haplotype and Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. *Genetics* 176: 685–696.
- CHOU M, CHEN YM, LIN CY, 1989. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. *Plant Physiol.* 89: 617–621.
- CHUANG S, BLATTNER F, 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 5242–5252.
- CLARKE MR, 1996. The role cephalopods in the world's oceans: an introduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences* 351: 979-983.
- COE EH JR, NEUFFER MG, HOISINGTON DA, 1988. *The genetics of corn*. In: GF Sprague and JWDudley (eds), Corn and Corn Improvement. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 81–258.
- COHEN R, YARDEN O, HADAR Y, 2002. Lignocellulose Affects Mn²⁺ Regulation of Peroxidase Transcript Levels in Solid-State Cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3156–3158.
- COLEMAN RG, SHARP KA, 2010. Protein Pockets: Inventory, Shape, and Comparison *J. Chem. Inf Model* 50: 589-603.

- COOPER VS, BENNETT AF, LENSKI RE, 2001. Evolution of Thermal dependence of Growth rate of *Escherichia coli* populations during 20,000 generations in a constant environment. *Evolution* 55: 889–896.
- COSSINS AR, BOWLER K, 1987. Temperature biology of animals. Chapman and Hall, New York.
- COSSINS AR, BEHAN MK, JONES G, BOWLER K, 1987. Lipid-protein interactions in the adaptive regulation of membrane function. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 77-81.
- CULLEN D, KERSTEN PJ, 1996. *Enzymology and molecular biology of lignin degradation*. In: The Mycota III (Brambl, R. & Marzluf, G. A., eds), pp. 295-312, Springer-Verlag, Berlin.
- CULLUM AJ, BENNETT AF, LENSKI RE, 2001. Evolutionary Adaptation to Temperature. IX. Preadaptation to Novel Stressful Environments of *Escherichia coli* Adapted to High Temperature. *Evolution* 55: 2194–2202.
- DA SILVA SP, BORGES-WALMSLEY MI, SILVA PEREIRA I, DE ALMEIDA SOARES CM, WALMSLEY AR, SOARES FELIPE MS, 1999. Differential expression of an *hsp70* gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Microbiology* 31: 1039–1050.
- DE GROOT P, 1999. Molecular aspects of growth and fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Katholieke Universiteit Nijmegen. Thèse.
- DELAUNAY A, ISNARD AD, TOLEDANO MB, 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo Journal*, 19: 5157-5166.
- DEREEPER A, AUDIC S, CLAVERIE JM, BLANC G, 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol.* 10: 8. (PubMed).
- DEREEPER A, GUIGNON V, BLANC G, AUDIC S, BUFFET S, CHEVENET F, DUFAYARD JF, GUINDON S, LEFORT V, LESCOT M, CLAVERIE JM, GASCUEL O, 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36 (Web Server issue): W465-9. Epub Apr 19. (PubMed).
- DEWITT TJ, SCHNEINER SM, eds (2004). Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches, Oxford University Press.
- DUAN YH, GUO J, DING K, WANG SJ, ZHANG H, DAI XW, CHEN YY, GOVERS F, HUANG LL, KANG ZS, 2011. Characterization of a wheat *HSP70* gene and its

- expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 38: 301- 307.
- DUNDAR A, ACAY H, YILDIZ A, 2009. Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. On mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *African Journal of Biotechnology* 8: 662-666.
- EASTWOOD DC, HERMAN B, NOBLE R, DOBROVIN-PENNINGTON A, SREENIVASAPRASAD S, BURTON KS, 2013. Environmental regulation of reproductive phase change in *Agaricus bisporus* By1-octen-3-ol, temperature and CO₂. *Fungal Genet Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.001>
- EDGAR RC, 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-7. (PubMed).
- ELBEIN, AD, 1974. The metabolism of α -Trehalose. Advances in Carbohydrate. *Chemistry and Biochemistry* 30: 227-256.
- ELBEIN AD, PAN YT, PASTUSZAK I, CARROL D, 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17-27.
- ELLENBERGER TE, BRANDL CJ, STRUHL K, HARRISON SC, 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha-helices - Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71: 1223-1237.
- EWING B, GREEN P, 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- ESCALANTE S, RELLO R, RELLO F, 2000. "El sector agropecuario mexicano: los desafíos del futuro", *Comercio Exterior*, vol. 50, núm. 11.
- ESCALANTE R, CATALÁN H, GALINDO L, 2005. Evolución del producto de sector agropecuario mexicano, 1960-2002: algunas regularidades empíricas. *Cuadernos Desarrollo Rural* 54: 87-112.
- ESCALANTE R, CATALÁN H, GALINDO L, REYES O, 2007, "Desagrarización en México: tendencias actuales y retos hacia el futuro. Documento de trabajo, México.
- FERMOR TR, WOOD DA, 1979. *The microbiology and enzymology of wheat straw mushroom compost production*. In: *Straw Decay and its Effect on Disposal and Utilization*, pp. 105-112. Edited by E. Grossbard. Chichester: John Wiley.

- FERMOR TR, RANDLE PE, SMITH JF, 1985. *Compost as a substrate and its preparation*. In: FLEGG PB, SPENCER DM, WOOD DA (eds) *The biology and technology of the cultivated mushroom*. Wiley, Chichester, pp 81-109.
- FERNÁNDEZ T, MARCET M, OLIVERA W, MARTÍN C, NEEL SCARSDALE J, REYNOLDS KA, 2003. Isolation and evaluation of thermotolerant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* for aguardiente and rum production. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 47: 2065–2071.
- FERREIRA AS, TOTOLA MR, BORGES AC, 2007. Physiological implications of trehalose in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. under thermal stress. *Journal of Thermal Biology* 32: 34-41.
- FEWELL J, GUSTAFSON C, 2007. Economic Analysis of Using Soybean Meal as a Mushroom Growing Substrate. Agribusiness and Applied Economics Report No. 617.
- FILLINGER S, CHAVEROCHE M-K, VAN DIJCK P, DE VRIES R. RUIJTER G, THEVELEIN J, D'ENFERT C, 2001. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 147:1851–1862.
- FINK-BOOTS M, MALARCZYCK E, LEONOWICZ A, 1991. Increased enzyme activities and level of superoxide anion and phenolic compounds in cultures of basidiomycetes after temperature stress. *Acta Biotochenologica*. 19: 319-330.
- FISHER RA, 1954. Statistical methods for research workers. 12th, Edinburgh: Oliver and Boyd 856.
- FLEGG PB, WOOD DA, 1985. *Growth and fruiting*. In: Flegg PB, Spencer DM, Wood DA, eds. *The biology of the cultivated mushroom*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p 141– 177.
- FOULONGNE-ORIOU M, SPATARO C, SAVOIE, JM, 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1184, 1125-1135.
- FOULONGNE-ORIOU M, RODIER A, CAUMONT P, SPATARO C, SAVOIE JM, 2011. *Agaricus bisporus* cultivars: hidden diversity beyond apparent uniformity, In : Savoie JM, Foulongne- Oriol M, Largeteau M, Barroso G (eds) *Proceedings of the 7th international conference on mushroom biology and mushroom products*, vol 2. pp 9-16. Available from http://wsmbmp.org/Previous_Conference_7.html.

- FOULONGNE-ORIOU M, SPATARO, CATHALOT V, MONLLOR S, SAVOIE JM, 2010. An genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* x *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genetics and Biology* 47: 226–236.
- FOULONGNE-ORIOU M, RODIER A, SAVOIE JM, 2012a. Relationship between Yield Components and Partial Resistance to *Lecanicillium fungicola* in the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*, Assessed by Quantitative Trait Locus Mapping. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2435–2442.
- FOULONGNE-ORIOU M, RODIER A, ROUSSEAU T, SAVOIE JM, 2012b. Quantitative trait locus mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap color of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2422-2434.
- FRANÇOIS J, PARROU JL, 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 125-145.
- FROVA C, 1997. *Genetic dissection of thermo-tolerance in maize*. In: Physical Stress in Plants (Grillo, S. and Leone, A.) (Eds.) New York: Springer-Verlag, pp. 31-38.
- FULTZ SA, 1988. Fruiting at High Temperature and Its Genetic Control in the Basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2460-2463.
- GANCEDO C, FLORES CL, 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 4: 351-9.
- GARCIA-SANDOVAL R, WANG Z, BINDER M, HIBBETT DS, 2011. Molecular phylogenetics of the Gloeophyllales and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown rot. *Mycologia*, 103: 510-524.
- GAO W, BAARS JJP, SONNENBERG ASM, VISSER R. Inheritance pattern of bruising sensitivity trait in *Agaricus bisporus*. In Savoie JM, Foulongne-Oriol M, Largeteau M, Barroso G, Editors: Proceedings of the Seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. [Electronic publication]. 2011; Vol 1. pp 43-51 [consulted on 05-11-2012]: Available at: http://www.wsbmp.org/Previous_Conference_7.html.
- GASCUEL O, 1997. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 685-695.

- GBOLAGADE J, AJAYI A, OKU I, WANKASI D, 2006. Nutritive Value of Common Wild Edible Mushrooms from Southern Nigeria. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 1: 16-21.
- GEA FJ, TELLO JC, NAVARRO MJ, 2003. Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *Journal of Phytopathology* 151: 98–100.
- GEORG RC, GOMES SL, 2007. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene* 386: 24-34.
- GEML J, LAURSEN GA, TAYLOR DL, 2008. Molecular diversity assessment of arctic and boreal *Agaricus* taxa. *Mycologia* 100: 577-589.
- GERRITS JPG, 1974. Development of a synthetic compost for mushroom growing based on wheat straw and chicken manure. *Meth. J. Agric. Sci.* 22: 175-194.
- GONZÁLEZ T, TERRÓN MC, ZAPICO EJ, TÉLLEZ A, YAGÜE S, CARBAJO JM, GONZÁLEZ AE, 2003. Use of multiplex reverse transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7083–7090.
- GOUDOT C, ETCHEBEST C, DEVAUX F, LELANDAIS G, 2011. The Reconstruction of Condition-Specific Transcriptional Modules Provides New Insights in the Evolution of Yeast AP-1 Proteins. *Plos One*, 6(6).
- GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O, 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol. Biol. and Evol.* 27: 221-224.
- GREAVES RB, WARWICKER J, 2007. Mechanisms for stabilisation and the maintenance of solubility in proteins from thermophiles. *BMC Struct. Biol.* 7:1–23.
- GROSS CA, 1996. *Function and regulation of the heat shock proteins*. Pp. 1382–1399 In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, et H. E. Umbarger, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 2d ed. ASM Press, Washington, DC.
- GUAN XJ, XU L, SHAO YC, WANG ZR, CHEN FS, 2008. Differentiation of commercial strains of *Agaricus* species in China with inter-simple sequence repeat marker. *World J. Microbiol Biot.* 24: 1617-1622

- GUINDON S, GASCUEL O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52: 696-704. (PubMed).
- GÜLER P, ARKAN O, 2007. Development of *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc. mycelium at different temperatures. *Hacettepe J. Biol. Chem.* 35: 93-96.
- HAHN GM, LI GC, 1990. *Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization*. In: Morimoto RI, Tissières A and Georgopoulos C (Eds) *Stress Proteins in Biology and Medicine* (pp79-100) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- HALL TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HALUSHKA MK, FAN J-B, BENTLEY K, HSIE L, SHEN N, WEDER A, COOPER R, LIPSHUTZ R, CHAKRAVARTI A, 1999. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics* 22: 239-247.
- HAMID, MI, ZENG F, CHENG J, JIANG D, FU Y, 2013. Disruption of heat shock factor 1 reduces the formation of conidia and thermotolerance in the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genet. Biol.* 53: 42-49.
- HAWKSWORTH DL, 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 6: 641-55.
- HAWKSWORTH DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN, 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. 616p.
- HECKATHORN SA, DOWNS CA, COLEMAN JS, 1999. Small Heat Shock Proteins Protect Electron Transport in Chloroplasts and Mitochondria During Stress. *Amer. Zool.* 39: 865-876.
- HECKER M, SCHUMANN W, VÖLKER U, 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19: 417–428.
- HEINEMANN P, 1956. Champignons récoltés au Congo Belge par Madame M. Goosens-Fontana. II *Agaricus* Fries s.s. Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles 26: 1-127.
- HERENDEEN SL, VANBOGELEN RA, NEIDHARDT FC, 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139:185–194.
- HIBBETT DS, BINDER M, BISCHOFF JF, BLACKWELL M, CANNON PF, ERIKSSON OE, UHNDORF S, JAMES T, KIRK PM, LÜCKING R, THORSTEN LUMBSCH H, LUTZONI F, MATHENY PB, MCLAUGHLIN DJ, POWELL MJ, REDHEAD S,

- SCHOCH CL, SPATAFORA JW, STALPERS JA, VILGALYS R, AIME MC, APTROOT A, BAUER R, BEGEROW D, BENNY GL, CASTLEBURY LA, CROUS PW, DAI YC, GAMS W, GEISER DM, GRIFFITH GW, GUEIDAN C, HAWKSWORTH DL, HESTMARK G, HOSAKA K, HUMBER RA, HYDE KD, IRONSDIE JE, KÖLJALG U, KURTZMAN CP, LARSSON KH, LICHTWARDT R, LONGCORE J, MIĄDLIKOWSKA J, MILLER A, MONCALVO JM, MOZLEY-STANDRIDGE S, OBERWINKLE F, PARMASIO E, REEB V, ROGERS JD, ROUX C, RYVARDEN L, SAMPAIO JP, SCHÜßLER A, SUGIYAMA J, THORN RG, TIBELL L, UNTEREINER WA, WALKER C, WANG Z, WEIR A, WEISS ML, WHITE MM, WINKA K, YAO YJ, ZHANG N, 2007. A higher- level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509- 547.
- HOCHACHKA PW, SOMERO GN, 2002. Biochemical Adaptation. Oxford University Press, New York.
- HOFFMANN AA, WATSON M, 1993. Geographical variation in the acclimation responses of *Drosophila* to temperature extremes. *Am. Nat.* 142: 93–113.
- HONG SW, LEE U, VIERLING E, 2003. *Arabidopsis* hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiol.* 132: 757–767.
- HORGEN PA, CASTLE A, 2002. *The application and potential of molecular approaches to mushrooms*. In: The Mycota XI. Agricultural Applications (Kempken, F., ed.) pp. 3-17. Springer- Verlag, Berlin.
- HOWARTH CJ, 2005. *Genetic improvements of tolerance to high temperature*. In: Ashraf, M. Harris, P.J.C. (Eds.), Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches. Howarth Press Inc., New York.
- HUEY R, HERTZ P, 1984. Is a Jack-of- all-Temperatures a Master of none? *Evolution* 38: 441-444.
- HUMAR MH, VAN GRIENSVEN LJLD, 2000. Gross- and microscopic anatomy of *Agaricus bisporus* in health and disease. *Mushroom Science* 15: 121-127.
- IBARRA D, ACOSTA A, 2003. El dilema campesino. Investigación económica, vol. LXII, núm. 245.
- IMBERNON M, CALLAC P, GRANIT S, PIROBE L, 1995. Allelic polymorphism at the mating typelocus in *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, and confirmation of the dominance of its tetrasporic trait. *Mushroom Science* 14 (1): 11-19.

- INGRAHAM JL, MARR AG, 1996. *Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth*. Pp. 1570–1576 in F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. LOW, B. MAGASANIK, W. S. REZNIKOFF, M. RILEY, M. SCHAECHTER, AND H. E. UMBARGER, eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 2d ed. ASM Press, Washington, DC.
- ISOYAMA T, MURAYAMA A, NOMOTO A, KUGE S, 2001. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276:21863- 21869.
- JOH JH, KIM BG, KONG WS, YOO YB, KIM NK, PARK HR, CHO BG, LEE CS, 2004. Cloning and developmental expression of a metzincin family metalloprotease cDNA from oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 239: 57–62.
- JOO YJ, KIM JH, KANG UB, YU MH, KIM J, 2011. Gcn4p-mediated transcriptional repression of ribosomal protein genes under amino-acid starvation. *Embo Journal*, 30 :859-872.
- JORGE JA, POLIZELI MDTM, Thevelein JM, Terenzi HF, 1997. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 154: 165–171.
- KARBAN R, BALDWIN IT, eds (1997). *Induced Responses to Herbivory*, University of Chicago Press. Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJJ, Burgman PWJJ, Konings AWT, 1995. Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp. Cell Res.* 219: 536–546.
- KARIAGA MG, NYONGESA HW, KEYA NCO, TSINGALIA HM, 2012. Compost physico-chemical factors that impact on yield in button mushrooms, *Agaricus bisporus* (Lge) and *Agaricus bitorquis* (Quel) Saccardo. *Journal of Agricultural Sciences* 3: 49-54.
- KERRIGAN RW, 1995. Global genetic resources for *Agaricus* breeding and cultivation. *Can. J. Bot.* 73: S973-S979
- KERRIGAN RW, 1996. Characteristics of a large collection of wild edible mushroom germ plasm: the *Agaricus* resource program 1-302-308. Veldhoven, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures and the World Federation for Culture Collections.

- KERRIGAN RW, 2002. Characteristics of a large collection of wild edible mushroom germ plasm: the *Agaricus* resource program. Veldhoven, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures and the World Federation for Culture Collections.1: 302-308.
- KERRIGAN RW, 2004. Trait diversity in wild *Agaricus bisporus* In: Romaine CP, Keil CB, Rinker DL, Royse DJ (eds) Mushroom science XVI, science and cultivation of edible and medicinal mushrooms, pp 31-38. *Genetics* 113: 225–236.
- KERRIGAN RW, CARVALHO DB, HORGAN PA, ANDERSON JB, 1998. The indigenous coastal Californian population of the mushroom *Agaricus bisporus*, a cultivated species, may be at risk of extinction. *Mol Ecol* 7: 35-45.
- KERRIGAN RW, IMBERNON M, CALLAC P, BILLETTE C, OLIVIER JM, 1994. The heterothallic life cycle of *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, and the inheritance of its tetrasporic trait, *Exp. Mycol.* 18: 193-210.
- KERRIGAN RW, ROYER JC, BALLER LM, KOHLI Y, HORGAN PA, ANDERSON JB, 1993. Meiotic behaviour and linkage relationship in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics* 113: 225–236.
- KHUSH R, BECKER E, WACH M, 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2971-2977
- KIMCHI-SARFATY CH, MI OH J, KIM I-W, SAUNA ZE, CALCAGNO AM, AMBUDKAR SV, GOTTESMAN MM, 2007. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 315: 525-528.
- KLUEVA NY, MAESTRI E, MARMIROLI N, NGUYEN HT 2001. *Mechanisms of thermotolerance in crops*. In AS Basra ed, Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress. Food Products Press, Binghamton, NY, pp 177–217.
- KOMAR AA, 2007. SNPs, Silent but not invisible. *Science* 315: 466-467.
- KOROTAEVA NE, ANTIPINA AI, GRABELYNCH OI, VARAKINA NN, BOROVSKII GB, VOINIKOV VK, 2001. Mitochondrial low-molecular-weight heat shock proteins and tolerance of crop plant's mitochondria to hyperthermia. *Fiziol. Biokhim Kul'turn. Rasten.* 29: 271–276.
- KOSUGI S, HASEBE M, N MATSUMURA, TAKASHIMA H, MIYAMOTO-SATO E, TOMITA M, YANAGAWA H, 2009. Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 478-485.

- KOYYALAMUDI SR, JEONG SC, SONG CH, CHO K. Y, PANG G, 2009. Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3351–3355.
- KÜES U, LIU Y, 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 141-152.
- KUHNER R, 1977. Variation of nuclear behaviour in the Homobasidiomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 68:1–16.
- LAHMAN O, RINKER DL, 2004. *Mushroom practices and production in Latin America: 1994-2002*. In: Rinker DL, Royse DJ, (eds). Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Penn State Univ. Press, Pennsylvania, p. 681-686.
- LANGE M, 1952. Species concepts in the genus *Coprinus*. *Dansk Bot Ark* 14:1–140.
- LARGETEAU ML, SAVOIE JM, 2008. Effect of the fungal pathogen *Verticillium fungicola* on fruiting initiation of its host, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 112: 825-828.
- LARGETEAU ML, LATAPY C, MINVIELLE N, REGNAULT-ROGER C, SAVOIE JM, 2010. Expression of phenol oxidase and heat-shock genes during the development of *Agaricus bisporus* fruiting bodies, healthy and infected by *Lecanicillium fungicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1499–1507.
- LARGETEAU ML, CALLAC P, NAVARRO-RODRIGUEZ AM, SAVOIE JM, 2011. Diversity in the ability of *Agaricus bisporus* wild isolates to fruit at high temperature (25 °C). *Fungal Biology* 115: 1186-1195.
- LEE SH, JOH JH, LEE JS, LIM JH, KIM KY, YOO YB, LEE CS, KIM BG, 2009. Isolation of Genes Specifically Expressed in Different Developmental Stages of *Pleurotus ostreatus* Using Microarray Analysis. *Mycobiology* 37: 230-237.
- LEE W, HASLINGER A, KARIN M, TJIAN R, 1987. Activation of transcription by 2 factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, 1987. 325(6102): p. 368-372.
- LEVINSON G, GUTMAN GA, 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203–221.
- LEWINSOHN D, NEVO E, HADAR Y, WASSER SP, BEHARAV A, 2000. Ecogeographical variation in the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. *Mycological Research* 104: 1184-1190.

- Li SF, 1980. Studies on the tolerance to elevated temperatures in *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. *Bibl. Mycol.* 76: 1-86.
- LIN CY, ROBERTS JK, KEY JL, 1984. Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 74: 152-160.
- LINDQUIST S, CRAIG EA, 1988. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 22: 631-677.
- LIN-ZHI K, FEI H, JUN-FANG L, LI-QIONG G, WEI-FANG B, 2013. Breeding of new high temperature- tolerant strains of *Flammulina velutipes*. *Scientia Horticulturae.* 151: 97-102.
- LLARENA HERNANDEZ RC, LARGETEAU M, FARNET AM, MINVIELLE N, REGNAULT-ROGER C, SAVOIE JM, 2011. Phenotypic variability in cultivars and wild strains of *Agaricus brasiliensis* and *Agaricus subrufescens*. In: Proceedings of the Seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. (JM Savoie, M Foulongne-Oriol, M Largeteau, G Barroso Eds). Vol 2. pp 176-181. INRA, France. 38-49. http://www.wsmbmp.org/Previous_Conference_7.html.
- LOFTUS M, MOORE D, ELLIOTT TJ, 1988. DNA Polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Theoretical and applied Genetics* 76: 712-718.
- LOFTUS M, BOUCHTI KL, ROBLES C, VAN GRIENSVEN LJLD, 2000. Use of SCAR marker for cap color in *Agaricus bisporus* breeding programs. *Mushroom Science* 15: 201-205
- LONG XY, LIU YX, ROCHELEAU H, OUELLET T, CHEN GY, 2011. Identification and validation of internal control genes for gene expression in wheat leaves infected by strip rust. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5: 255-267.
- LOS DA, MURATA N, 1999. Response to cold shock in cyanobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 221–230.
- LOVE ME, SMITH JF, RANDLE PE, 1986. The manipulation of temperature to synchronise flushing patterns in two strains of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Scientia Horticulturae* 29: 317-324.
- LU, Z, KONG X, LU Z, XIAO M, CHEN M, ZHU L, SHEN Y, HU X, SONG S, 2014. Para-aminobenzoic acid (PABA) synthase enhances thermotolerance of mushroom *Agaricus bisporus*. *PLOS ONE.* 9, E91298.

- MAESTRI E, KLUEVA N, PERROTTA C, GULLI M, NGUYEN HT, MARMIROLI N, 2002. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol. Biol.* 48: 667-681.
- MAGAN N, 2008. *Ecophysiology: impact of environment on growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production* In Boddy L, Frankland J.C., van West P. Eds. Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Academic Press. London. pp 63-78.
- MARTÍNEZ-CARRERA D, MORALES P, SOBAL M, BONILLA M, MARTÍNEZ W, 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. In: El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata & H. Leal (eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- MATTHIJS MW, 2005. Urea metabolism in the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Thèse Universiteit Nijmegen.
- MIERSCH J, GRANCHAROV K, 2008. Cadmium and heat response of the fungus *Heliscus ugdunensis* isolated from highly polluted and u polluted areas. *Amino Acids* 34: 271–277.
- MILLER RE, KANANEN DL, 1972. Bipolar sexuality in the mushroom. *Mushroom Sci* 13:713– 718.
- MINER BG, SULTAN, S E MORGAN SG, PADILLA DK, RELYEA, RA, 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 685–692.
- MITCHELL AD, BRESINSKY A, 1999. Phylogenetic relationships of *Agaricus* species based on ITS-2 and 28S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91: 811-819.
- MONTERO-BARRIENTOS M; CARDOZA R E, GUTIERREZ S, MONTE E, HERMOSA R, 2007. The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers hermotolerance to *T. harzianum*. *Current. Genetics* 52:45-53.
- MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, NICOLAS C, CARDOZA RE, GUTIERREZ S, MONTE E, 2008. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genet. Biol.*45: 1506-1513.
- MOQUET F, DESMERGER C, MAMOUN M, RAMOS-GUEDES-LAFARGUE M, OLIVIER JM, 1999. A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap colour. *Fungal Genet. Biol.*28: 34-42.

- MOORE AJ, CHALLEN MP, WARNER PJ, ELLIOTT TJ, 2001. RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. *Appl. Microbiol. Biot.* 55: 742-9.
- MOORE D, GANGE AC, GANGE EG, BODDY L, 2008. *Fruiting bodies: their production and development in relation to environment*. In Boddy L, Frankland J.C., van West P. Eds. Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Academic Press, London. Pp 80-104.
- MOQUET F, DESMERGER C, MAMOUN M, RAMOS-GUEDES-LAFARGUE M, OLIVIER JM, 1999. A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap color. *Fungal Genet Biol* 28: 34-42
- MORAIS MH, RAMOS AC, MATOS N, SANTOS-OLIVEIRA EJ, 2000. Production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on ligninocellulosic residues: note. *Food Sci. Technol. Int.* 6: 123–128.
- MORIN PA, LUIKART G, WAYNE RK, the SNP workshop group*, 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *TRENDS Ecol. Evol.* 19: 208-216.
- MORIN E, KOHLER A, BAKER AR, FOULONGNE-ORIOU M, LOMBARD V, NAGY LG, ROBIN A, OHM RA, PATYSHAKULIYEVA A, BRUN A, AERTS AL, BAILEY AM, BILLETTE C, COUTINHO PM, DEAKIN G, DODDAPANENI H, FLOUDAS D, GRIMWOOD J, HILDEN K, KÜES U, LABUTTI KM, LAPIDUS A, LINDQUIST EA, LUCAS SM, MURAT C, RILEY RW, SALAMOV A., SCHMUTZL J, SUBRAMANIAN V, WÖSTEN HAB, XU J, EASTWOOD DC, FOSTER G, SONNENBERG ASM, CULLEN D, DE VRIES RP, LUNDELL T, HIBBETT DS, HENRISSAT B, BURTON KS, KERRIGAN RW, CHALLEN MP, GRIGORIEV IV, FRANCIS MARTIN F, 2012. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 109:17501-17506.
- NAIR NG, MACAULEY BJ, 1987. Dry bubble disease of *Agaricus bisporus* and *A. bitorquis*, and its control by prochloraz – manganese complex. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 30: 107–116.
- NAVARRO P, SAVOIE JM, 2014. Selected wild strains of *Agaricus bisporus* produce significant yields of mushrooms at 25°C. *Rev Iberoam Micol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.014>.
- NEI M, LI W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 76: 5269-5273.

- NICOT N, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, EVERS D, 2005. Housekeeping gene selection for realtime RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56: 2907-14.
- OSORIO MP, SALAMANCA G, 2009. Propiedades Fisicoquímicas y valor nutrimental del champiñón (*Agaricus bisporus*). III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba Argentina. 15 al 17 de noviembre de 2009.
- OSPINA-GIRALDO MD, COLLOPY PD, ROMAINE CP, ROYSE DJ, 2000. Classification of sequences expressed during the primordial and basidiome stages of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Genet. Biol.* 29: 81–94.
- PFAFFL MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1;29:45.
- PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L, 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Research*, 30 (9).
- PAPADOPOULOS JS, AGARWALA R, 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*, 23: 1073-1079.
- PARSELL DA, LINDQUIST S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.* 27: 437–96.
- PATHAK R, JOSHI N, DWIVEDI RR, 2009. Eco-friendly production of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (white button mushroom). *Nat. Sci.* 6: 57–60.
- PATIST A, ZOERB H, 2005. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* 40: 107-113.
- PEET MM, WILLITS DH, 1998. The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. *Agric. Forest Meteorol.* : 191–202.
- PERIHAN GÜLER P, ARKAN O, 2007. Development of *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. Mycelium at different temperatures. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 35 (2), 93-96.
- PIGLIUCCI M, 2001. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture (Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD).
- PIGLIUCCI M, 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* 20: 481-486.

- PLESOFSKY-VIG N, BRAMBL R, 1993. Heat shock proteins in fungi. In: Stress Tolerance of Fungi, ed. DH Jennings, Marcel Dekker Inc., New York, 45-68.
- PRADA C, SCHIZAS NV, YOSHIOKA PM, 2008. Phenotypic plasticity or speciation? A case from a clonal marine organism. *BMC Evolutionary Biology* 8: 47.
- PROSSER CL, 1991. Environmental and metabolic animal physiology: comparative animal physiology. 4th ed. Wiley-Liss, New York.
- RAPER CA, RAPER JR, MILLER RE, 1972. Genetic analysis of the cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64: 1088-1117.
- RATKOWSKY, DA, OLLEY J, ROSS T, 2005. Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *J. Theor. Biol.* 233: 351–362.
- REINKE AW, BAEK J, ASHENBERG O, KEATING AE, 2013. Networks of bZIP Protein-Protein Interactions Diversified Over a Billion Years of Evolution. *Science*, 340: p. 730-734.
- RENSING L, MONNERJAHN C, MEYER U, 1998. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 159- 166.
- REY M, LLOBELL A, MONTE E, SCALA F, LORITO M, 2004. Genomics of *Trichoderma*. In Fungal genomics, applied mycology and biotechnology. (Kachatourians G G,' ed), pp. 225– 248. Elsevier Science, Amsterdam.
- RHONE B, 2008. Étude de mécanismes génétiques impliqués dans l'adaptation climatique de populations expérimentales de blé tendre. Thèse. Univ. Paris-Sud.
- ROBINSON-RECHAVIA M, ALIBÉSB A, GODZIK A, 2006. Contribution of electrostatic interactions. Compactness and quaternary structure to protein thermostability: lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* 356: 547–557.
- RODRIGUES-POUSADA C, MENEZES RA, PIMENTEL C, 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27: 245-258.
- RODRIGUES-POUSADA, CA, NEVITT T, MENEZES R, AZEVEDO D, PEREIRA J, AMARAL C, 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS LETTERS* 567: 80- 85.
- ROYSE DJ, MAY B, 1982. Use of isozyme variation to identify genetic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* 74: 93-102.

- ROZEN S, SKALETISKY HJ, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- SABEHAT A, WEISS D, LURIE S, 1998. Heat-shock proteins and cross tolerance in plants. *Physiol. Plant* 103: 437–441.
- SADLER M, 2003. Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin* 28: 305–308.
- SAKAMOTO Y, 2010. Protein expression during *Flammulina velutipes* fruiting body formation. *Mycoscience* 51: 163-169.
- SÁNCHEZ C, 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 756- 762.
- SÁNCHEZ C, 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1321–1337.
- SAVOIE JM, MATA G, 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia* 95: 191-199.
- SAVOIE JM, 2008. *Reactive oxygen Species and the strategy of antioxidant defense in mushrooms*. In: Proceedings of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. (J.I. Leleý and J.A. Buswell Eds) pp 8-20. GAMU, Krefeld, Germany.
- SAVOIE JM, BRUNEAU D, MAMOUN M, 1996. Resource allocation ability of wild isolates of *Agaricus bisporus* on conventional mushroom compost. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 285-292.
- SCIEGLINSKA D, PIGLOWSKI W, CHEKAN M, MARUREK A, KRAWCZYK Z, 2011. Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study. *Histochem. Cell Biol.* 135: 337–350.
- SENTHIL-KUMAR M, KUMAR G, SRIKANTHBABU V, UDAYAKUMAR M, 2007. Assessment of variability in acquired thermotolerance: potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes. *Journal of Plant Physiology* 164: 111–125.
- SHIRASAKA NK, YOSHIDA K, TERASHIMA Y, WATANABE T, AYUSAWA S, TERASHITA T, 2006. Effect of trehalose on the heat tolerance of *Lentinula edodes* mycelia. *Mush. Sci. Biotechnol.* 14: 11-18.

- SIMON A, GURRIA A, 2000. Relationship between quality of mushroom (*Agaricus bisporus*) at harvest and post-harvest self-life. *ITEA Production Vegetal* 96: 124-131.
- SINGER MA, LINDQUIST S, 1998a. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo, *Mol. Cell* 1: 369– 648.
- SINGER MA, LINDQUIST S, 1998b. Thermotolerance in *S. cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose, *Trends Biotechnol.* 16: 460– 68.
- SLATE J, GRATTEN J, BERALDI D, STAPLEY J, HALE M, PEMBERTON JM, 2009. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetics* 136: 97– 107.
- SMITH JF, WOOD DA, THURSTON CF, 1995. Growth measurement of *Agaricus* mycelium in composted substrates as an indicator of compost selectivity and mushroom productivity. *Mushroom Sci.* 14: 293-301.
- SOBAL M, MARTINEZ-CARRERA D, MORALES P, ROUSSOS S, 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micol. Apl. Int.* 19:15- 23.
- SOBIERALSKI K, SIWULSKI M, JASIŃSKA A, FRUŻYŃSKA-JOŹWIAK D, SAS-GOLAK I, SZYMAŃSKI J, 2010. Impact of infection with *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* isolates on the yielding of some wild strains of *Agaricus bitorquis* from different regions of Poland. *Phytopathologia* 58: 5–11.
- Soden DM, Dobson ADW, 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755- 1763.
- SONNENBERG ASM, BAARS JP, HENDRICKX PM, LAVRIJSSEN B, GAO W, WEIJN A, MES JJ, 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In Savoie JM, Foulongne-Oriol M, Largeteau M, Barroso G (eds), Proceedings of the 7th international conference on mushroom biology and mushroom products, vol 1. pp 7- 15. Available from http://wsmbmp.org/Previous_Conference_7.html.
- SPEAR MC, ROYSE DJ, MAY B, 1983. Atypical meiosis and joint segregation of biochemical loci in *Agaricus brunnescens*. *J. Hered.* 74: 417-420.
- SPRENT P, 1989. Applied nonparametric statistical methods. Chapman & Hall, London.
- STANIASZEK M, MARCZEWSKI W, SZUDYGA K, MASZKIEWICZ J, CZAPLICKI A, QIAN G, 2002. Genetic relationship between Polish and Chinese strains of the mushroom

- Agaricus bisporus* (Lange) Sing., determined by the RAPD method. *J Appl Genet* 43: 43-47.
- STEVENS GC, FOX JF, 1991. The causes treeline. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 177-91.
- STRAATSMA GA, GERRITS JPG, AUGUSTIJNM PAM, OP DEN CAMPH JM, VOGELS GD, VAN GRIENSVEN LJLD, 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 135: 751-759.
- SUGIYAMA K, IZAWA S, INOUE Y, 2000. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 15535-15540.
- SULTAN SE, 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function, and life-history. *Trends in Plant Science* 5: 537-542.
- SUMMERBELL RC, CASTLE AJ, HORGAN PA, ANDERSON JB, 1989. Inheritance of restriction fragment length polymorphisms in *Agaricus brunnescens*. *Genetics* 123: 293-300.
- TAKEMOTO D, TANAKA A, SCOTT B, 2007. NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet Biol* 44: 1065-1076.
- THEOCHARI I, CALLAC P, ATHANASSIOU Z, NIKOLAOU A, GUINBERTEAU J, 2003. Inventory of *Agaricus bisporus* in Greece. *Dasike Ereuna* 16: 11-16.
- THEVELEIN JM, 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*. 48: 42- 59.
- THIBERT-PLANTE X, HENDRY AP, 2010. When can ecological speciation be detected with neutral loci? *Molecular Ecology* 19: 2301-2314.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 11:4673-80.
- TODGHAM AE, PATRICIA M, SCHULTE PM, IWAMA GK, 2005. Cross-Tolerance in the Tidepool Sculpin: The Role of Heat Shock Proteins. *Physiological and Biochemical Zoology* 78: 133–144.

- TONOMURA H, 1978. *Flammulina velutipes*. In S. T. Chang and W. A. Hayes (ed.), Biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, Inc., New York. p. 409-421.
- TRAVISANO M, LENSKE RE, 1996. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics* 143: 15– 26.
- VÄLI U, BRANDSTRÖM M, JOHANSSON M, ELLEGREN, H, 2008. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 9 (8).
- VANBOGELEN AR, KELLEY MP, NEIDHARDT CF, 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulation and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 26–32.
- VETTER J, BERTA E, 2005. Mercury content of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Food Control* 16: 113–116.
- VIGH L, MARESCA B, HARWOOD JL, 1998. Does the membrane physical state control the expression of heat shock and other genes? *TIBS* 23:369-374.
- VIGNAL A, MILAN D, SAN CRISTOBAL M, EGGEN A, 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275–305.
- WAHID A, SHABBIR, A, 2005. Induction of heat stress tolerance in barley seedling by presowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regul.* 46: 133-141, 2005.
- WANG ZS, CHEN LF, CHEN MY, 2003. Study on the thermo-tolerance related genes of *Agaricus bisporus*. *Mycosystema* 22 (suppl.): 325-328.
- WANG ZS, CHEN LF, CHEN MY, 2004. Thermo-tolerance –related genes in *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 16: 133-137.
- WANG Z, CHEN L, CHEN M, LIAO J, DONG J, SONG S, 2004. Thermotolerance-related genes in *Agaricus bisporus*. In: Romaine CP, Keil CB, Rinker DJ, Royse DJ (eds), Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi. Pp. 133-137. Pennsylvania State Univ., Etats-Unis. ISBN 1-883956-01-13.
- WANG DG, FAN J-B, SIAO C-J, BERNO A, YOUNG P, SAPOLSKY R, GHANDOUR G, PERKINS N, WINCHESTER E, SPENCER J, KRUGLYAK L, STEIN L, HSIE L, TOPALOGLOU T, HUBBELL E, ROBINSON E, MITTMANN M, MORRIS MS, SHEN N, KILBURN D, RIOUX J, NUSBAUM C, ROZEN S, HUDSON TJ, LIPSHUTZ R,

- CHEE M, LANDER ES, 1998. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 280: 1077-1082.
- WEIJN A, TOMASSEN MMM, BASTIAAN-NET S, WIGHAM MLI, BOER EPJ, HENDRIX EAHJ, BAARS JJP, SONNENBERG ASM, WICHERS HJ, MES JJ, 2012. A new method to apply and quantify bruising sensitivity of button mushrooms. *LWT - Food Science Technology* 47: 308-314
- WILSON EO, 1997. Introduction. In: Reaka-Kudla, M.L., Wilson, D.E., Wilson, E.O. (Eds.), *Biodiversity II*, J. Henry Press, Washington, D.C., pp. 1–3. Wirth D, Christians ES, Drion PV,
- DESSY-DOIZE C, GUSTIN P, 2003. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70: biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann Méd Vét* 147:127–144.
- WOOD DA, FERMOR TR, 1985. Nutrition of *A. bisporus*. In: *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*, pp. 43-61. Edited by P. B. Flegg, D. M. Spencer & D. A. Wood. Chichester: Wiley.
- WOOD MJ, STORZ G, TJANDRA N, 2004. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature*, 430: 917-921.
- XIA X, 1995. Body temperature, rate of biosynthesis, and evolution of genome size. *Mol. Biol. Evol.* 12: 834–842.
- XU J, DESMERGER C, CALLAC P, 2002. Fine-scale genetic analyses reveal unexpected spatialtemporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology* 148: 1253-1262.
- XU J, KERRIGAN RW, CALLAC P, HORGAN PA, ANDERSON JB, 1997. Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial button mushroom. *Journal of Heredity* 88: 482-488.
- XU J, KERRIGAN RW, SONNENBERG AS, CALLAC P, HORGAN PA, ANDERSON JB, 1998. Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Mol Ecol* 7, 19-33.
- YAN C, LEE LH, DAVIS LI, 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-life transcription factor. *Embo Journal* 17: 7416-7429.
- YANO JK, POULOS TL, 2003. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Curr. Opin. Biotech.* 14: 360–65.

- YOUNG TP, STANTON ML, CHRISTIAN CE. 2003. Effects of natural and simulated herbivory on spine lengths of *Acacia drepanolobium* in Kenya. *Oikos* 101: 171–179.
- ZELDOVICH KB, CHEN P, SHAKHNOVICH EI, 2007. Protein stability imposes limits on organism complexity and speed of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 16152–16157.
- ZHAO R, KARUNARATHNA S, RASPÉ O, PARRA L A, GUINBERTEAU J, MOINARD M, DE KESEL A, BARROSO G, COURTECUISSÉ R, HYDE KD, GUELLY AK, DESJARDIN DE, CALLAC P, 2011. Major clades in tropical *Agaricus*. *Fungal Diversity* 51: 279-296.

